



Testování kontrastních látek pro diagnostiku a terapii

Bakalářská práce

Studijní program: B3944 – Biomedicínská technika
Studijní obor: 3901R032 – Biomedicínská technika
Autor práce: **Denisa Půlpánová**
Vedoucí práce: doc. Ing. Daniel Jirák, Ph.D.





Testing of contrast agents for diagnostics and therapy

Bachelor thesis

Study programme: B3944 – Biomedical Technology
Study branch: 3901R032 – Biomedical Technology
Author: **Denisa Půlpánová**
Supervisor: doc. Ing. Daniel Jirák, Ph.D.





Zadání bakalářské práce

Testování kontrastních látek pro diagnostiku a terapii

Jméno a příjmení: **Denisa Půlpánová**
Osobní číslo: D16000011
Studijní program: B3944 Biomedicínská technika
Studijní obor: Biomedicínská technika
Zadávací katedra: Fakulta zdravotnických studií
Akademický rok: **2018/2019**

Zásady pro vypracování:

Cíle práce:

1) Ověřit vlastnosti multimodální kontrastní látky z hlediska zobrazování magnetickou rezonancí a optickým zobrazováním.

2) Experimentálně ověřit toxicitu multimodální kontrastní látky na buněčné linii.

Teoretická východiska (včetně výstupu z kvalifikační práce):

Kontrastní látky se využívají při zobrazovacích metodách jako je magnetická rezonance. Používají se k lepšímu zobrazení kontrastu a struktur v těle. Dále se také využívají k zvýraznění patologických struktur či k funkčnímu zobrazení. Typy kontrastních látek se rozlišují dle toho, jak a na co se používají. Výstupem bakalářské práce bude článek k případné publikaci v odborném periodiku.

Výzkumné předpoklady / výzkumné otázky:

1) Jak velká koncentrace roztoků multimodálních kontrastních látek je nutná pro detekci magnetickou rezonancí a optickým zobrazováním?

2) Jak velká koncentrace roztoků multimodálních kontrastních látek není pro buněčné linie toxická?

3) Hodnocení kontrastních látek z hlediska MR kontrastu (relaxace).

Metoda:

Experimentální výzkum

Technika práce, vyhodnocení dat:

Technika práce: měření na relaxometru, analýza vzorků z hlediska toxicity

Data budou zpracována pomocí tabulek v programu Microsoft Office Excel 2010. Text bude zpracován textovým editorem Microsoft Office Word 2010.

Místo a čas realizace výzkumu: Místo:

Laboratoře Institutu klinické a experimentální medicíny, Praha

Laboratoře Fakulty zdravotnických studií Technické univerzity v Liberci, Liberec

Čas: prosinec 2018 leden 2019

Vzorek:

Kontrastní látky. Buněčné linie.

**Seznam odborné literatury:**

- 1) FERDA, Jiří et al. Inovativní zobrazovací metody. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-186-5.
- 2) BENEŠ, J., D. JIRÁK a F. VÍTEK. Základy lékařské fyziky. 4.vyd. Praha: Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2645-1.
- 3) BROWN, Keith C. Essentials mathematics for NMR and MRI spectroscopists. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2017. ISBN 978-1-78262-797-5.
- 4) FERDA, Jiří et al. Základy zobrazovacích metod. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-164-3.
- 5) CONSTANTINIDES, Christakis. Magnetic resonance imaging: the basics. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2014. ISBN 978-1-4822-1731-5.
- 6) CLARIDGE, Timothy D. W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-08-099986-9.
- 7) BUSHONG, Stewart C. a Geoffrey D. CLARKE. Magnetic resonance imaging: physical and biological principles. 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-07354-7.
- 8) WESTBROOK, Catherine. Handbook of MRI technique. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1-118-66162-8.
- 9) CALLAGHAN, Paul T. Translational dynamics and magnetic resonance: principles of pulsed gradient spin echo NMR. Oxford: Oxford University Press, 2014. ISBN 978-0-19-870082-1.
- 10) TÓTH, É. a A. E. MERBACH, eds. The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2013. ISBN 978-1-119-99176-2.
- 11) HAIDEKKER, Mark A. Medical imaging technology. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4614-7072-4.
- 12) TENG, Quincy. Structural biology: practical NMR applications. 2nd ed. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4899-7382-5.
- 13) VASSILIOU, Vassilios et al. Magnetic resonance imaging: Physics basics for the cardiologist. JRSN Cardiovascular Disease. 2018, 7. DOI 10.1177/2048004018772237.
- 14) ISPELTER, J., M. LUPU a A. BRIGUET. NMR Probeheads for biophysical and biomedical experiments: theoretical & practical guidelines. 2.vyd. London: Imperial College Press, 2015. ISBN 978-1-84816-662-2.
- 15) MAJUMDAR, A., R. K. WARD a K. INIEWSKY. MRI: physics, image reconstruction and analysis. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2016. ISBN 978-1-4822-9889-5.

Vedoucí práce:

doc. Ing. Daniel Jirák, Ph.D.
Fakulta zdravotnických studií

Datum zadání práce:

1. září 2018

Předpokládaný termín odevzdání:

30. června 2019

L. S.

prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA
děkanprof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA
děkan

V Liberci 30. listopadu 2018

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že texty tištěné verze práce a elektronické verze práce vložené do IS STAG se shodují.

6. 5. 2019

Denisa Půlpánová

Abstrakt

Autor: Denisa Půlpánová

Instituce: FZS – Biomedicínská technika

Název práce: Testování kontrastních látek pro diagnostiku a terapii

Vedoucí práce: doc. Ing. Daniel Jiráček, Ph.D.

Počet stran: 58

Rok obhajoby: 2019

Anotace: V této bakalářské práci se snažíme osvojit si práci s buněčnými liniemi a měření na magnetické rezonanci. Snažíme se také osvojit si pracovní postupy měření na spektrofotometru a optickém přístroji na fluorescenci. Teoretická část se zabývá magnetickou rezonancí a kontrastními látkami. Naším cílem je osvojit si postupy pro testování cytotoxicity kontrastních látek, které pak dále měříme magnetickou rezonancí a optickým zobrazováním.

Klíčová slova: magnetická rezonance, kontrastní látky, buněčné linie, optické zobrazování

Abstract

Author: Denisa Půlpánová

Institution: FZS – Biomedical technology

Title: Testing of contrast agents for diagnostics and therapy

Supervisor: doc. Ing. Daniel Jiráček, Ph.D.

Pages: 58

Year: 2019

Annotation: This bachelor thesis is concerned in operations with cell lines and magnetic resonance imaging. It is also concerned in operations of the spectrophotometer and fluorescence optical imaging. The theoretical part is focused on magnetic resonance and contrast agents. Our goal is to learn how to do cytotoxicity testing of contrast agents which are later measured on magnetic resonance and optical imaging.

Keywords: magnetic resonance, contrast agents, cell lines, fluorescence, optical imaging

Obsah

Seznam použitých zkratk	11
1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Magnetická rezonance	13
2.1.1 Uvedení do problému	13
2.1.2 Historie	13
2.1.3 Fyzikální princip	14
2.1.3.1 Magnetické momenty jader	14
2.1.3.2 Magnetické pole	15
2.1.3.3 Precese	15
2.1.3.4 Spin	16
2.1.3.5 Zeemanův jev	16
2.1.3.6 Boltzmannovo rozdělení	16
2.2 Jev magnetické rezonance	17
2.2.1 Larmorova frekvence	17
2.2.2 Rezonance	18
2.2.3 Příčný a podélný vektor magnetizace	18
2.3 Relaxační procesy	19
2.3.1 Relaxace	19
2.3.2 T_1 relaxace	20
2.3.3 T_2 relaxace	21
2.4 Rekonstrukce MR obrazu	22
2.4.1 Repetiční čas	23
2.4.2 Echo čas	23
2.4.3 Fourierova transformace	23
2.5 Zobrazovací sekvence	24
2.6 Kontrastní látky pro magnetickou rezonanci	24
3 TEORETICKÁ ČÁST	25
3.1 Cíle a výzkumné předpoklady	25

3.2 Použitý materiál a pomůcky	26
3.3 Příprava buněk	26
3.3.1 Rozmražení buněk	26
3.3.2 Pasážování buněk	27
3.4 HepG2 buňky	28
3.5 Testování cytotoxicity MTT Assay	29
3.5.1 Průběh MTT Assay	30
3.5.1.1 Nasazení buněk	30
3.5.1.2 Přidání cytotoxické látky	32
3.5.1.3 Nárůst buněk	33
3.5.1.4 Přidání MTT	35
3.5.2 Výsledky a vyhodnocení dat	37
3.6 Měření buněk na magnetické rezonanci	42
3.7 Fluorescenční měření kontrastní látky.....	48
4 Závěr a doporučení	51
Seznam použité literatury	53
Seznam obrázků	55
Seznam tabulek	57
Seznam grafů	58

Seznam použitých zkratek

T	Termodynamická teplota
k	Boltzmannova konstanta
ω	Úhlová Larmorova frekvence
γ	Gyromagnetický poměr
MR	Magnetická rezonance
MRI	Zobrazování magnetickou rezonancí
FID	Free induction decay
RF	Radiofrekvenční
TR	Repetiční čas
TE	Echo čas
PDT	Zdvojnásobení populace
PSF	Point spread function
SNR	Signal to noise ratio
NaCl	Chlorid sodný
DMSO	dimethylsulfoxid

1 ÚVOD

Magnetická rezonance je neinvazivní zobrazovací metoda založená na interakci jader atomů s magnetickým polem. Kontrastní látky se pro měření magnetickou rezonancí používají k lepšímu zobrazení kontrastu struktur v těle.

Bakalářská práce poukazuje na testování kontrastních látek pomocí testu cytotoxicity, zobrazováním magnetickou rezonancí a fluorescenčním měřením. Námi testované kontrastní látky slouží jako budoucí nosiče pro další látky, kterými mohou být například léčiva. Je proto důležité provést cytotoxický test, abychom zjistili, jestli je daná kontrastní látka na bázi nosiče pro buněčné linie toxická či nikoliv. Je nutné provést měření na magnetické rezonanci a optickém přístroji, abychom popsali vlastnosti kontrastní látky na bázi nosiče a citlivost na detekci pomocí magnetické rezonance.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Magnetická rezonance

2.1.1 Uvedení do problému

Magnetická rezonance neboli zkráceně MR je neinvazivní zobrazovací metoda, která je založená na rozložení a chování magnetických momentů jader atomů. Atomy jsou složeny z elektronů, protonů a neutronů. Pro zobrazování magnetickou rezonancí se využívají protony kvůli svým magnetickým vlastnostem ve vnějším statickém magnetickém poli a schopnosti absorbovat energii radiofrekvenčního magnetického pole. Princip tedy vychází z interakce jader atomů s magnetickým polem. [1] [2]

2.1.2 Historie

Vznik magnetické rezonance je spojován s objevením jaderného spinu v roce 1924 W. Paulim. Ovšem první konstrukci velmi jednoduché magnetické rezonance uskutečnil až v roce 1938 I. I. Rabi, který i jako první demonstroval interakci jader atomů s magnetickým polem.

V roce 1945 skupiny vědců pod vedením F. Blocha a E. Purcella zdokonalili metodu magnetické rezonance, a ta se následně začala využívat v analýze pro chemii a fyziku. Ovšem první využití v biomedicínské oblasti se objevuje až v 70. letech 20. století.

V roce 1973 P. Lauterbur přišel s dalším pokrokem, a to s tomografickým MR zobrazováním, kdy navrhl kódovat prostorovou informaci gradientem magnetického pole. Samotné kódování a Fourierovu transformaci pro matematickou analýzu signálů z MR zavedl v roce 1975 R. Ernst. Tuto analýzu poté vylepšil a publikoval Sir P. Mansfield v roce 1977. V tomto roce také jako první zkonstruoval R. Damadian magnetickou rezonanci pro snímání celého těla.

První komerčně vyráběné MRI přístroje poskytující anatomické obrazy se objevují v roce 1980 firmou FONAR. V roce 1982 byla provedena první MR angiografie, která

slouží k zobrazení krevního průtoku, a v roce 1992 byl uskutečněn první experiment s funkční magnetickou rezonancí, která zobrazuje mozkovou aktivitu. [1] [3]

2.1.3 Fyzikální princip

Jev magnetické rezonance spočívá v interakci jader atomů. Konkrétně v interakci jejich magnetických momentů s radiofrekvenčním magnetickým polem. Důležitá je zde přítomnost vnějšího statického magnetického pole, díky němuž výše zmíněnou interakci můžeme detekovat ve formě absorpce kvant. Tato absorpce se dá detekovat u každého izotopu, který má nenulový magnetický moment. Nejčastěji se využívá atomu vodíku ^1H , jelikož se nachází ve vodě a dalších organických sloučeninách, které jsou vysoce zastoupeny ve tkáních. Využívají se ale i izotopy dalších prvků jako jsou ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na a ^{31}P .

Jádra atomů mají jaderný spin, díky kterému se pak chovají jako magnetický dipól, kdy mohou být buď ve vysokoenergetickém a nebo nízkoenergetickém stavu. Dle toho jsou pak orientovány rovnoběžně vůči magnetickému poli. Když jsou ve vysokoenergetickém stavu, tak jsou orientovány proti magnetickému poli a naopak, když jsou v nízkoenergetickém stavu, tak jsou orientovány po směru. Při přechodu mezi těmito dvěma stavy dochází k absorpci nebo vyzáření energie. Magnetická rezonance je nejvíce citlivá na jádra atomů vodíku, a to díky gyromagnetickému poměru. [1] [2] [3] [4]

2.1.3.1 Magnetické momenty jader

Protony atomů rotují kolem své vlastní osy, tato rotace se označuje jako spin. Díky tomu si vytvářejí ve svém okolí magnetické pole a tím pádem tam vzniká i magnetický moment. Pro zobrazování magnetickou rezonancí nelze použít atomová jádra, která mají sudá nukleonová čísla, jelikož se jejich magnetické momenty navzájem ruší, a tím pádem se nechovají magneticky. Naopak atomová jádra s lichým nukleonovým číslem mají výsledný magnetický moment nenulový.

Když není proton v magnetickém poli, tak má svůj magnetický moment orientován v náhodném směru. Ovšem pokud se proton nachází v silném magnetickém poli, tak se jeho vektor magnetického momentu orientuje paralelně jako vektor magnetického pole nebo antiparalelně. Díky tomu se pak tkáň chová jako magnetická. Záleží i na počtu protonů v tkáni, který ovlivňuje velikost výsledného magnetického momentu.

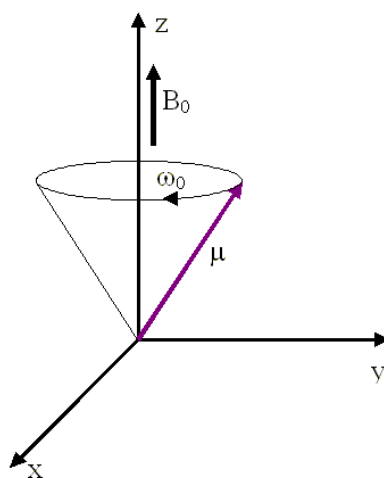
Kromě toho, že proton má svůj spin, neboli rotaci kolem své vlastní osy, má také pohyb precesní, který si lze představit jako pohyb po plášti kužele, který rotuje. [5] [6]

2.1.3.2 Magnetické pole

Statické magnetické pole je označováno jako B_0 , někdy také označováno jako primární pole, do něhož jsou pak vloženy protony. Další pole je takzvané transverzální B_T neboli B_1 , které je na B_0 kolmé. Jednotkou je Tesla. [7]

2.1.3.3 Precese

Precesní pohyb neboli precesi vykonává proton v magnetickém poli jako rotační pohyb kolem pláště kužele. Tento rotační pohyb má svou frekvence, která se nazývá Larmorova frekvence. Ta závisí na gyromagnetickém poměru protonu a také na intenzitě vnějšího magnetického pole. [8] [9]



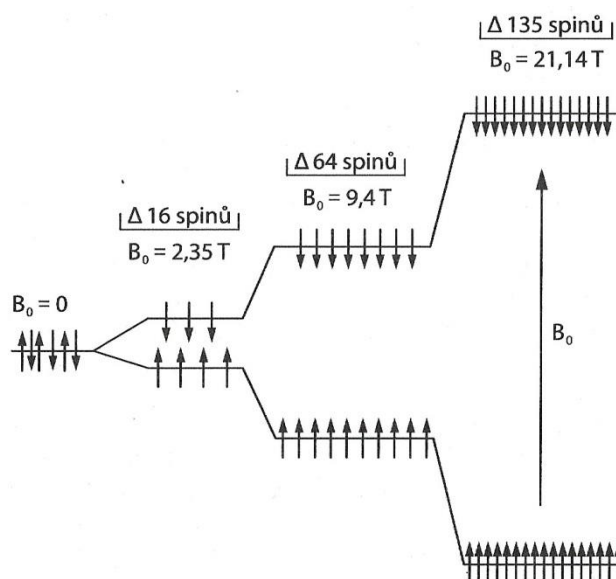
Obrázek 1 *Precese* [2]

2.1.3.4 Spin

Protony rotují kolem své vlastní osy, přičemž tento rotační pohyb se nazývá spin. Díky tomu vzniká u protonů s lichým nukleonovým číslem magnetické pole a tím pádem i magnetický moment. U protonů se sudým nukleonovým číslem se jejich magnetické momenty ruší, a proto se navenek jeví jako magneticky neutrální. [8] [10]

2.1.3.5 Zeemanův jev

Zeemanův jev je pojmenován po holandském fyzikovi Pieteru Zeemanovi, který ho jako první popsal. Jedná se o to, že pokud jsou jádra atomů vystavena silnému magnetickému poli, dochází ke štěpení jejich energetických hladin. Energetické hladiny mají v magnetickém poli B_0 rozdílné velikosti energií. [1] [11]



Obrázek 2 Zeemanův jev, štěpení energetických hladin v závislosti na zvyšujícím se magnetickém poli [1]

2.1.3.6 Boltzmannovo rozdělení

Boltzmannovo rozdělení je definováno jako

$$N_{E-} / N_{E+} = e^{\Delta E / kT}$$

Rovnice 1 [1]

kde N_{E+} je počet protonů, které se nacházejí ve vyšším energetickém stavu, N_{E-} je počet protonů na nižším energetickém stavu. ΔE je potom rozdíl těchto hladin. T je termodynamická teplota a k je Boltzmannova konstanta.

Čím větší je magnetické pole, tím víc roste i rozdíl populací a citlivost magnetické rezonance. Zároveň čím větší je rozdíl populací, tím více se absorbuje energie. [1] [12]

2.2 Jev magnetické rezonance

Lidské tělo je tvořeno zhruba z 80% vodou, která obsahuje atom vodíku. Vodík má také největší gyromagnetický poměr. Proto se hojně využívá k měření magnetickou rezonancí. Když je atom vodíku, respektive jeho proton, mimo magnetické pole, tak jeho magnetický moment je orientován náhodně a neuspořádaně. Ovšem po vložení protonu vodíku do magnetického pole B_0 se jeho magnetický moment M orientuje paralelně nebo antiparalelně s magnetickým polem B_0 . Antiparalelně se orientuje menšina protonů, jelikož je to energeticky více náročné. [13]

2.2.1 Larmorova frekvence

Proton vložený do magnetického pole má nejenom svůj vlastní spin, neboli rotační pohyb kolem své osy, ale také uskutečňuje precesní pohyb. Frekvence precesního pohybu se nazývá Larmorova frekvence. Ta je přímo úměrně závislá na gyromagnetickém poměru protonu a také na intenzitě magnetického pole. Larmorova frekvence je definována vztahem

$$\omega = \gamma \cdot B_0 \quad \text{Rovnice 2 [13]}$$

kde ω je úhlová Larmorova frekvence a γ je gyromagnetický poměr, což je materiálová konstanta dané pro konkrétní jádro.

Aby bylo možné detekovat i malé změny vektoru magnetizace M , který je v ustáleném stavu orientován jako siločáry magnetického pole B_0 , je nutné ho „sklopit“ do roviny XY, která je kolmá na rovinu Z. Poté se aplikuje vysokofrekvenční magnetický impuls, který má stejnou frekvenci jako je Larmorova frekvence protonů

neboli frekvence jejich precesního pohybu. V důsledku pak vzniká jev, která se nazývá magnetická rezonance. [5] [13]

2.2.2 Rezonance

Jak již bylo zmíněno, protony mají v magnetickém poli svůj vektor magnetizace stejný směr jako siločáry magnetického pole B_0 a není ho tím pádem možné takto změřit. Mimo to se také protony pohybují v různých fázích a jejich magnetický moment se při precesi v čase mění. Proto je nutné jejich vektor magnetizace vychýlit. K tomu dojde tím, že se protonu dodá energie pomocí vysokofrekvenčního impulsu. Je nutné, aby frekvence tohoto impulsu byla shodná s Larmorovou frekvencí protonu. Následně pak dojde k jevu magnetické rezonance, jehož důsledkem je to, že se zmenší vektor podélné magnetizace protonů (ve směru osy Z) a zároveň začnou protony svůj precesní pohyb vykonávat ve stejné fázi. Výsledkem tohoto jevu je pak vznik vektoru příčné magnetizace. [14] [15]

2.2.3 Příčný a podélný vektor magnetizace

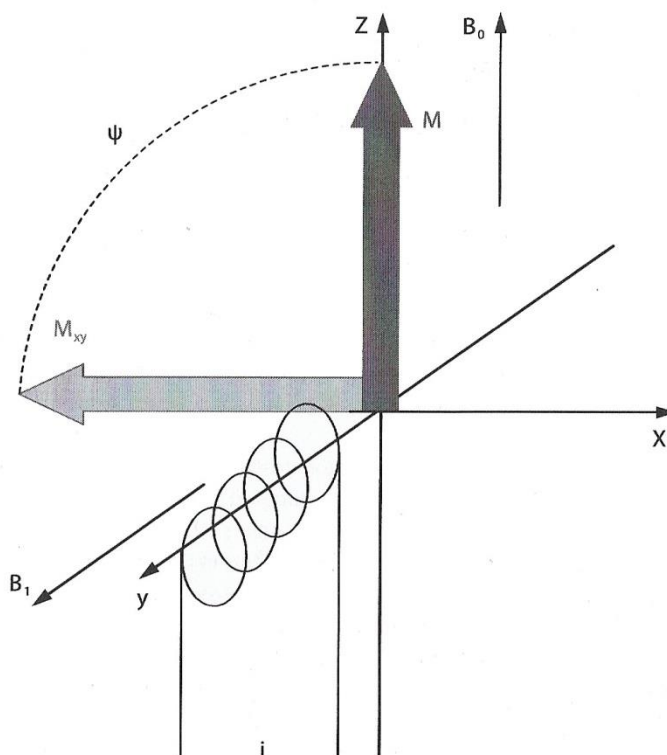
Podélný vektor magnetizace protonu je orientován ve stejném směru jako siločáry magnetického pole. Když bychom si představili osy X , Y , Z , tak podélný vektor je na ose Z , stejně jako siločáry pole. Protony mohou být orientovány paralelně nebo antiparalelně, neboli v kladné části osy Z , či v záporné části osy Z . Jelikož je podélný vektor nasměrován stejně jako magnetické pole, nelze ho měřit přímo. Aby byl vektor magnetizace měřitelný, musí být příčný.

Příčný vektor magnetizace vznikne tak, že na magnetické pole působí krátký radiofrekvenční pulz, který má za následek to, že původní podélný vektor magnetizace, který byl orientován ve směru osy Z , se překlápí o 90° do roviny X , Y . Frekvence radiofrekvenčního pulzu by měla být shodná s frekvencí precesního pohybu protonů. [16]

2.3 Relaxační procesy

2.3.1 Relaxace

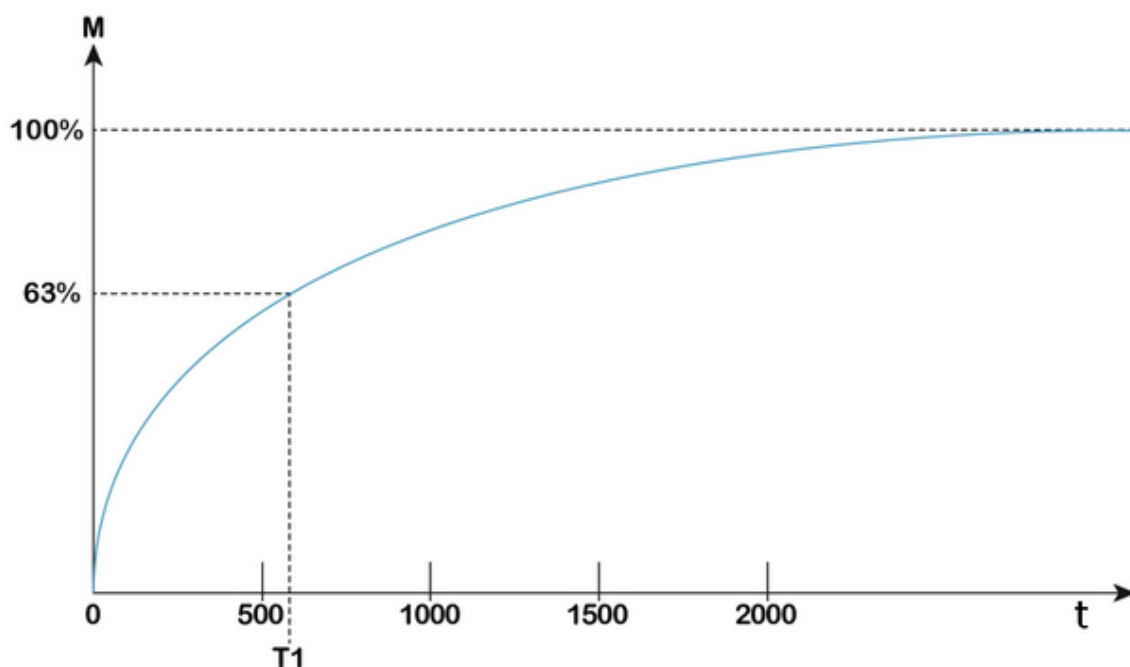
Relaxace nastává ve chvíli, kdy se protony, které byly vybuzené RF pulzem a měly stejnou fázi, vrací do ustáleného stavu. Respektive jejich vektor magnetizace se z roviny X, Y vrací zpět do roviny podél osy Z. Při relaxaci dochází k uvolňování absorbované energie například ve formě tepla a také k přechodům jader mezi energetickými hladinami na hladiny v ustáleném stavu. Rychlost relaxačního procesu se liší pro různé typy tkání. Obvykle však tento proces trvá v rozmezí mikrosekund až sekund. Závisí to také například na velikosti magnetického pole, velikosti molekul, chemické vazbě, teplotě apod. Signál, který je při relaxačních procesech detekován, vzniká rotací vektoru magnetizace M_{xy} v rovině, která je kolmá na magnetické pole B_0 . Detekovaný signál se nazývá Free Induction Decay neboli FID. FID je dále zpracován například Fourierovou transformací, kdy se signál převádí z časové do frekvenční oblasti. Při relaxaci se uplatňují dva relaxační procesy, které na sobě nejsou závislé, a tím jsou T_1 relaxace, jinak nazývaná jako spin-mřížková nebo podélná relaxace, a T_2 relaxace neboli spin-spinová relaxace. [13] [17]



Obrázek 3 *Sklopení vektoru magnetizace do kolmé roviny působení pole B_1 buzeného proudem vysílací cívky [1]*

2.3.2 T_1 relaxace

T_1 relaxace, nazývaná také jako spin-mřížková, podélná neboli longitudinální, je dána návratem vektoru magnetizace M do ustáleného stavu tak, že dojde k obnově podélné složky, která je stejně orientovaná jako vnější magnetické pole B_0 . Při T_1 relaxaci dochází k překlopení jaderných spinů a výměně energie mezi excitovanými atomy a okolním prostředím, respektive do okolní atomové mřížky. Proto se někdy tato relaxace nazývá spin-mřížková. Protony mají tendenci se z roviny X, Y vrátit zpět do rovnovážné magnetizace v ose Z, která je pro ně energeticky výhodnější. To probíhá tak, že dochází průběžně v nárůstu podélné magnetizace ve směru osy Z, která je rovnoběžná s magnetickým polem B_0 . Návrat vektoru magnetizace do ustáleného stavu v ose Z má exponenciální průběh.



Obrázek 4 *Průběh T_1 relaxace [13]*

Tento návrat do ustáleného stavu se dá také vyjádřit matematickým vztahem

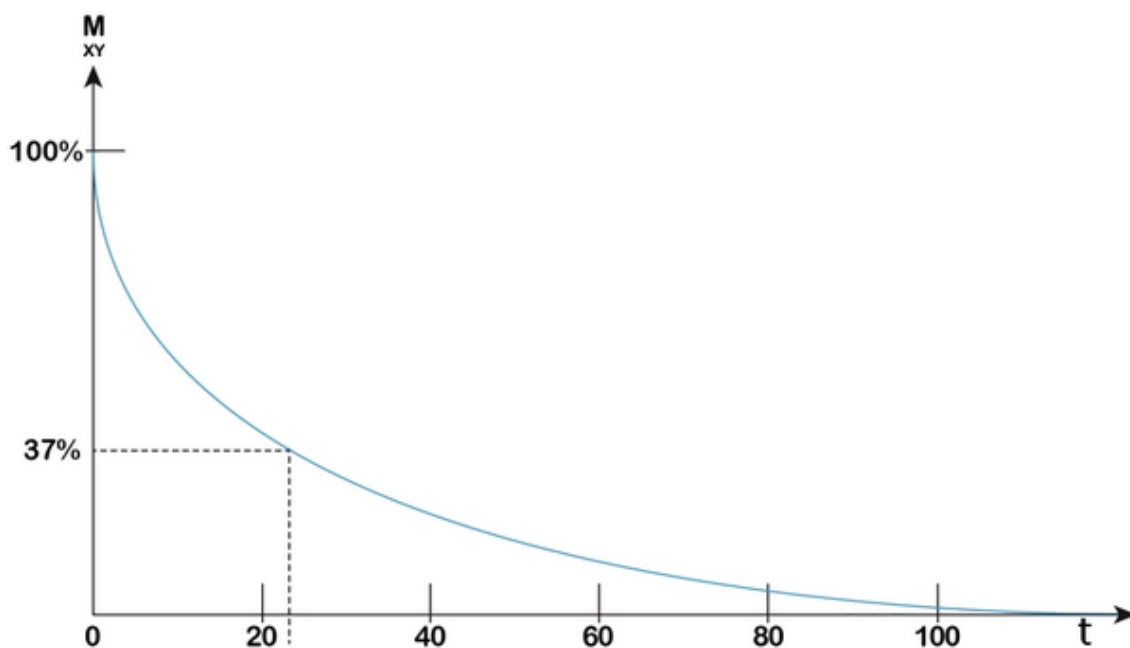
$$M_Z = M_0 \cdot (1 - e^{-t/T_1}) \quad \text{Rovnice 3 [13]}$$

kde M_Z je velikost magnetizace v ose Z, M_0 je velikost magnetizace v ustáleném stavu, t je čas po 90° RF pulzu a T_1 je relaxační čas.

T_1 lze také definovat jako čas od doby skončení RF pulzu, který je nutný k obnově 63 % vektoru magnetizace M . Tato hodnota vychází ze vzorce pro T_1 relaxaci. Kdyby se totiž hodnoty času t a T_1 rovnaly, výsledek $1 - e^{-t/T_1}$ by byl 0,63. Dále také platí, že čím větší je velikost magnetického pole, tím více stoupá velikost T_1 . Respektive čím kratší je čas T_1 , tím rychleji dochází k návratu do ustáleného stavu. [13]

2.3.3 T_2 relaxace

T_2 relaxace nazývaná také jako spin-spinová, příčná neboli transverzální, je charakterizována časem T_2 , který udává rychlost poklesu magnetizace M_{xy} v rovině, která je kolmá na magnetické pole B_0 . Po RF pulzu začnou mít protony precesní pohyb ve stejné fázi. Při T_2 relaxaci nedochází ke změně energie soustav excitovaných atomů, jako tomu je při T_1 relaxaci. T_2 relaxace také není tolik závislá na velikosti vnějšího magnetického pole B_0 a její doba je kratší než doba T_1 relaxace. Důsledkem je i úbytek intenzity detekovaného signálu FID.



Obrázek 5 Průběh T_2 relaxace [13]

Pokles magnetizace M_{xy} lze definovat matematickým vztahem

$$M_{xy} = M_{xy0} \cdot e^{-t/T_2} \quad \text{Rovnice 4 [13]}$$

kde M_{xy} je vektor magnetizace v rovině X, Y, M_{xy0} je maximální velikost vektoru magnetizace v příčné rovině po skončení RF pulzu, t je čas po RF pulzu a T_2 je relaxační čas. Relaxační čas T_2 lze také definovat jako dobu, kdy magnetizace M_{xy} v rovině, která je kolmá na vnější magnetické pole B_0 , klesne na 37 % původní hodnoty. To vychází ze vzorce pro T_2 relaxace, jelikož když by se časy t a T_2 rovnaly, tak by hodnota pro e^{-t/T_2} byla rovna 0,37. [13]

2.4 Rekonstrukce MR obrazu

Kontrast MR obrazu je ovlivněn relaxačními procesy a hustotou excitovaných atomů, neboli odpovídající velikosti magnetizace M . Obrazy magnetické rezonance se liší dle protonové hustoty nebo kontrastem daným relaxačními časy T_1 a T_2 různých tkání. Jeden objekt je tedy možné naměřit s různým kontrastem v závislosti například i na zobrazovací sekvenci.

Pro prostorové kódování MR signálu se používají přídavná lineární magnetická pole neboli gradienty. Magnetická indukce gradientů se sčítá se statickým magnetickým polem B_0 . Když na objekt, který je měřen, nejsou aplikovány gradienty, tak je ve všech místech magnetické pole B_0 stejné a Larmorova frekvence protonů je také stejná. Následně pak signál, který je detekován na přijímací cívce, obsahuje pouze jednu rezonanční frekvenci. Když se však ale na měřený objekt aplikují gradienty, dochází k tomu, že magnetické pole B_0 je v určitých místech slabší a v jiných silnější. Což znamená, že výsledné pole je závislé na prostorových souřadnicích X, Y, Z. Z toho vyplývá, že i Larmorova frekvence, která je úměrná magnetickému poli, bude různá a závislá na poloze.

Takto lze definovat konkrétně vybranou oblast, ze které je MR signál obsahující prostorové informace snímán, a to umožní následnou rekonstrukci MR obrazu. [16] [18]

2.4.1 Repetiční čas

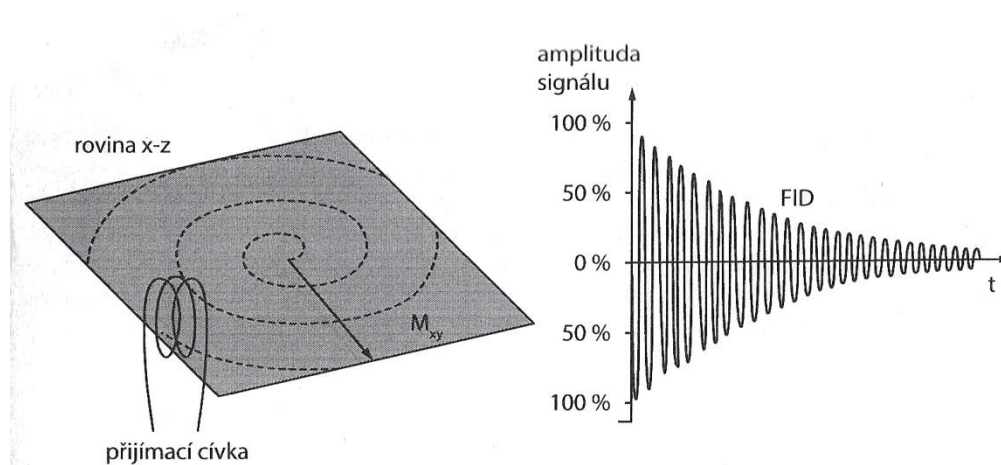
Repetiční čas TR, z anglického time repetition, je interval mezi dvěma radiofrekvenčními pulzy. Čas TR především ovlivňuje kontrast MR obrazu, který je daný spin-mřížkovou relaxací T_1 . Krátký čas TR se obvykle používá pro T_1 vážené obrazy a naopak dlouhý čas TR se obvykle používá pro T_2/T_2^* vážené obrazy. [16]

2.4.2 Echo čas

Echo čas TE, z anglického echo time, je časový interval mezi excitačním radiofrekvenčním pulzem a náběrem dat. Čas TE především ovlivňuje kontrast MR obrazu, který je daný spin-spinovým relaxačním časem T_2 a nebo T_2^* . Krátký čas TE se obvykle používá pro T_1 vážené obrazy a dlouhý čas TE pro T_2/T_2^* vážené obrazy. [16]

2.4.3 Fourierova transformace

Fourierova transformace je matematický nástroj, který převádí signál FID z časové do frekvenční oblasti, neboli vzniká spektrum. Signál FID je detekován v přijímacích cívkách, kde se díky precesy příčné složky magnetizace M indukuje signál. Nejvyšší amplitudu má FID signál hned po RF pulzu a následně amplitudy klesají kvůli relaxačním procesům a nehomogenitám magnetického pole. [2] [19]



Obrázek 6 FID signál a jeho detekce [1]

2.5 Zobrazovací sekvence

Zobrazovací sekvence mají vždy minimálně jeden excitační radiofrekvenční pulz a gradienty pro výběr vrstvy a kódování. Kombinací RF pulzů a gradientů se vytvoří různé zobrazovací sekvence. Tím lze dosáhnout i různých kontrastů. Mezi základní zobrazovací sekvence patří spin-echo sekvence a sekvence gradientního echa.

Spin-echo sekvence je tvořena ze dvou RF pulzů a z gradientů. Po 90° excitačním pulzu následuje 180° pulz v čase $TE/2$. Díky 180° pulzu, který sfázovává spiny, docílíme většího MR signálu neboli echa. Sekvence gradientního echa 180° pulz neobsahuje. Její excitační pulz má malý sklápěcí úhel a její repetition time TR je krátký. Proto je i měření pomocí gradientního echa rychlé. [1] [20]

2.6 Kontrastní látky pro magnetickou rezonanci

Kontrastní látky se při měření magnetickou rezonancí používají ke zlepšení obrazu, konkrétně k lepšímu zviditelnění struktur v těle. Díky kontrastní látce se urychlí relaxace protonů, což vede ke zkrácení relaxačních časů T_1 a T_2 . Tím dojde k zesílení signálu na T_1 váženém obrazu. Naopak zkrácením relaxačního času T_2 , dojde k zeslabení signálu na T_2 váženém obrazu. Obecně lze kontrastní látky používané pro měření na magnetické rezonanci rozdělit na paramagnetické a superparamagnetické. Paramagnetické kontrasty většinou obsahují gadolinium, které je vázáno jako chelátový komplex, jelikož samotné gadolinium je pro člověka toxické. Superparamagnetické látky jsou většinou na bázi nanočástic oxidů železa. [17] [21]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části jsme testovali cytotoxicitu nosiče kontrastní látky, kterou byl glykogen. Test se prováděl pomocí MTT Assay a buňky, na kterých byl glykogen testován, byly HepG2 buňky hepatocelulárního karcinomu. MTT Assay byla prováděna na dvou mikrotitračních destičkách, kdy v jedné byla koncentrace MTT 0,5 mg/ ml a ve druhé byla koncentrace MTT 1 mg/ ml. Obě destičky byly následně změřeny na spektrofotometru s vlnovými délkami 495 nm a 620 nm. Prováděli jsme také měření na magnetické rezonanci v Institutu klinické a experimentální medicíny, kdy jsme měřili citlivost magnetické rezonance tak, že jsme se pokoušeli detekovat různý počet buněk. Celkem bylo použito 8 zkumavek s různými počty HepG2 buněk. Dále jsme prováděli fluorescenční měření na optickém přístroji, kdy jsme nejprve dvěma laboratorním myším indukovali buňky prsního karcinomu 4T1 a následně jim injekčně aplikovali fluorescenční kontrastní látku na bázi mannanu jako nosiče kontrastní látky. Myši byly poté v časových intervalech měřeny na optickém přístroji IVIS Lumina, kde byla měřena fluorescence.

3.1 Cíle a výzkumné předpoklady

V rámci tématu bakalářské práce bylo naším cílem osvojit si především práci s buněčnými liniemi a měření na magnetické rezonanci. Cílem bylo také osvojit si postupy měření na spektrofotometru a optickém přístroji na fluorescenci. Provedli jsme test cytotoxicity pro kontrastní látku na bázi glykogenu pomocí MTT Assay. Cílem bylo zjistit od jaké koncentrace nebo zdali vůbec je tato kontrastní látka pro buňky toxická. Dále jsme provedli měření magnetickou rezonancí a optickým zobrazováním. Cílem bylo popsat vlastnosti kontrastních látek a citlivost na detekci buněk pomocí magnetické rezonance.

3.2 Použitý materiál a pomůcky

Buněčná linie HepG2 kultivovaná na naší univerzitě, buněčná linie 4T1 kultivovaná v Institutu klinické a experimentální medicíny, kontrastní látka na bázi glykogenu, kontrastní látka na bázi mannanu, kultivační médium DMEM, Fetal Bovine Serum FBS,

pufr PBS, antibiotikum Primocin, trypsin Edta 0,05%, MTT Tetrazolyl blue tetrazolium bromide, ethanol 70%, 0,1M NaCl, 0,1M glycin, destilovaná voda, sérologické pipety, pipetovací nástavec, kultivační lahve, multikanálová pipety, plastové špičky, mikrotitrační destičky, falkonky, zkumavky a pipety s plastovými špičkami.

3.3 Příprava buněk

Abychom mohli začít s prací na výzkumné části, bylo nejdřív nutné si připravit buňky.

3.3.1 Rozmražení buněk

Buňky byly uchovány zamražené v dusíku a v mrazáku, kde byla teplota -80°C. Po celou dobu práce je nutno udržovat co největší sterilitu.

Práce na buňkách se provádí v laminárním boxu, který je nutné pravidelně vysvěcovat UV lampou pro zničení choroboplodných zárodků a před začátkem práce se musí jeho pracovní plocha vytřít 70% ethanolem. Laminární box je laboratorní zařízení, které filtruje vzduch pomocí filtrů a HEPA filtrů. To zajišťuje práci ve sterilním prostředí, jelikož vzduch v boxu proudí skrz filtry, které vychytávají nežádoucí částice, na kterých mohou být různé mikroorganismy.

Po sterilizaci laminárního boxu vytřením 70% ethanolem si do něj připravíme vše, co budeme potřebovat k rozmražení buněk. Konkrétně to je pipetovací nástavec a k němu 2 sérologické pipety o celkovém objemu 10 ml a další 2 o celkovém objemu 5 ml, stojan na falkonky a na kryozkumavky, pipetman o maximálním objemu 1 ml a k němu 1 ml sterilní špičky, falkonky o objemu 15 ml a 50 ml a 25 cm² kultivační lahev. Před tím, než cokoli vložíme do laminárního boxu, je nutné to ostříkat a otřít 70% ethanolem, aby vše bylo co nejvíce sterilní. Do boxu ještě vložíme kultivační médium, které jsme nahřáli ve vodní lázni na 37°C.

Poté, co máme vše potřebné připraveno v laminárním boxu, si vyndáme buňky z dusíku nebo z mrazáku. Vytaženou kryozkumavku, ve které jsou zamražené buňky, držíme pinzetou za víčko a ponoříme ji do vodní lázně tak, aby se víčko neponořilo a voda nevnikla k buňkám. Buňky roztáhneme pouze tak, aby v nich zůstal ještě malý krystalek ledu. Poté kryozkumavku ostříkáme ethanolem a vložíme do laminárního boxu do stojánku. Celý její obsah přepipetujeme pomocí pipetmana do 50 ml falkonky a

přidáme k tomu 10 ml kultivačního média. Následně falkonku zavřeme, její víčko označíme a vložíme ji do centrifugy na 5 minut a nastavíme 1500 RPM neboli 1500 otáček za minutu. Vždy je nutné dát do protilehlé polohy ještě další falkonku na vyvážení, která má v sobě stejný objem tekutiny. Díky centrifuze dosáhneme toho, že se buňky oddělí od roztoku a zůstanou na dně falkonky.

Buňky z centrifugy vyndáme, vložíme do laminárního boxu a odsajeme od nich pipetou roztok, ve kterém byly. Odsátý roztok se přepipetuje do 15 ml falkonky. K buňkám pak přidáme pipetou 5 ml kultivačního média. Je nutné celý obsah důkladně propipetovat, aby se buňky správně smísily s médiem, a také aby se od sebe oddělily a nebyly ve shlucích. Následně tuto buněčnou suspenzi odpipetujeme do 25 cm² kultivační lahve, kterou pak vložíme do inkubátoru, kde se buňky nechají několik dní rozrůstat. Rychlost buněk záleží na typu buněk.

3.3.2 Pasážování buněk

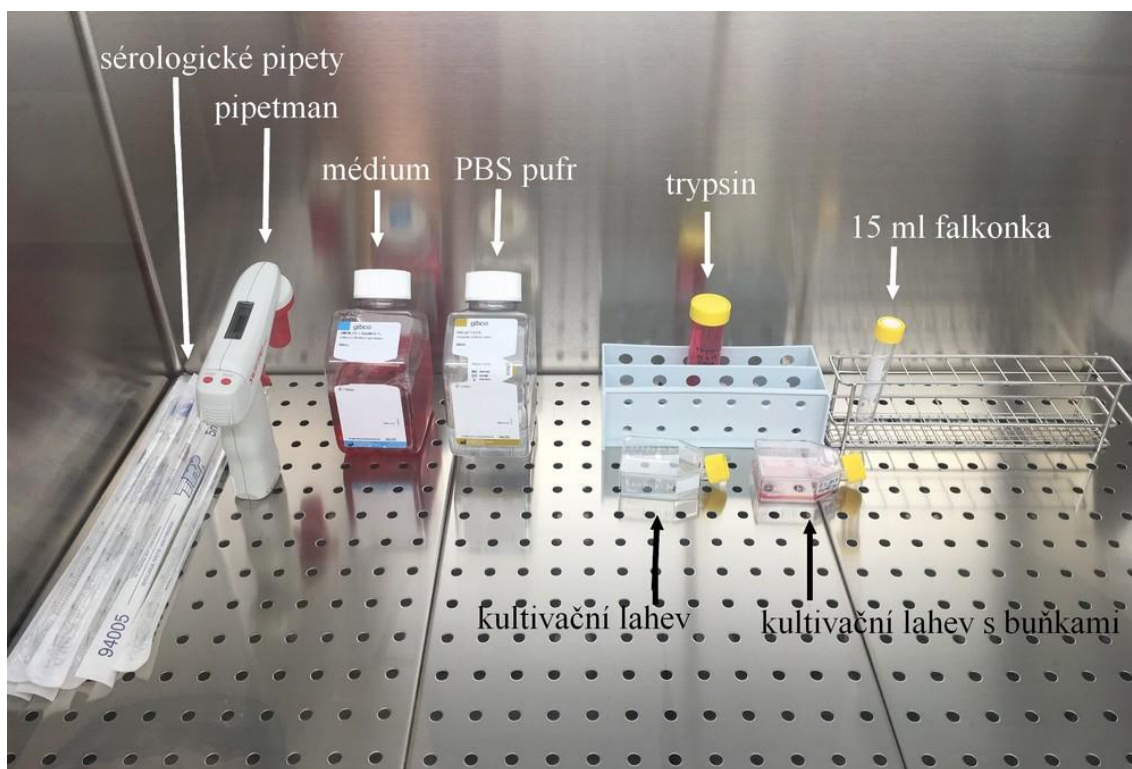
Pasážování buněk se provádí v okamžiku, kdy je jejich konfluence alespoň 70%, neboli když přisedlé buňky pokrývají alespoň 70 % povrchu dna kultivační lahve. Toto můžeme zjistit pod mikroskopem. Pasážování se provádí proto, že z média, ve kterém se buněčná linie kultivuje, se po určité době vyčerpají živiny a buňky do něj vypouští své metabolity, a také proto, aby buňky měly prostor pro jejich růst. Je tedy nutné část buněčné linie odebrat, smísit s novým médiem a dát do nové kultivační lahve.

K pasážování buněk si musíme do laminárního boxu dát pipetovací nástavec a k němu příslušné sérologické pipety, stojánky a novou kultivační lahev. Dále dáme do boxu předem nahřáté roztoky na 37°C, což jsou kultivační médium, trypsin a pufr PBS nebo HBSS. Než cokoliv vložíme do laminárního boxu, musíme to ostříkat 70% ethanolem pro co největší sterilitu. Poté co máme vše připravené, si vyndáme z inkubátoru kultivační lahev, ve které jsou buňky. Buněčnou linii zkontrolujeme pod mikroskopem, kdy se díváme na to, jaká je konfluence, jejich tvar a jestli se u buněk popřípadně nevyskytla kontaminace. Poté kultivační lahev opět dezinfikujeme a vložíme do laminárního boxu.

Z kultivační lahve nejprve odsajeme staré médium 5 ml pipetou nebo speciální jehlou, kterou je nutno sterilizovat plamenem kahanu. Po odsátí média se k přisedlým buňkám 5 ml pipetou přidá 5 ml pufru PBS nebo HBSS. Pomocí pufru se buňky

opláchnou. Pro lepší efekt s položenou kultivační lahví děláme krouživé pohyby. Pufr následně odsajeme 5 ml pipetou a přidáme k buňkám 1 ml trypsinu. Ten slouží k tomu, aby se buňky, které jsou přisedlé, oddělily ode dna kultivační lahve. Buňky s trypsinem dáme na 5 minut do inkubátoru.

Po 5 minutách zkontrolujeme pod mikroskopem, jestli se buňky oddělily ode dna. Pro lepší efekt můžeme lehce poklepat na bok kultivační lahve. Ke ztrypsinizovaným buňkám přidáme 4 ml kultivačního média a důkladně propipetujeme, aby došlo k narušení shluku buněk. Do nové kultivační lahve nejprve pipetou přidáme 4 ml média a poté z původní kultivační lahve odsajeme 1 ml buněčné suspenze a tu přidáme ke 4 ml média. Ředění by mělo být vždy 1:4, neboli jeden díl buněčné suspenze a 4 díly nového média. Takto zpasážívané buňky zkontrolujeme pod mikroskopem a popíšeme kultivační lahve, kde napíšeme datum pasážování, naše jméno, název buněčné linie, poměr ředění a číslo pasáže. Kultivační lahev vložíme do inkubátoru.

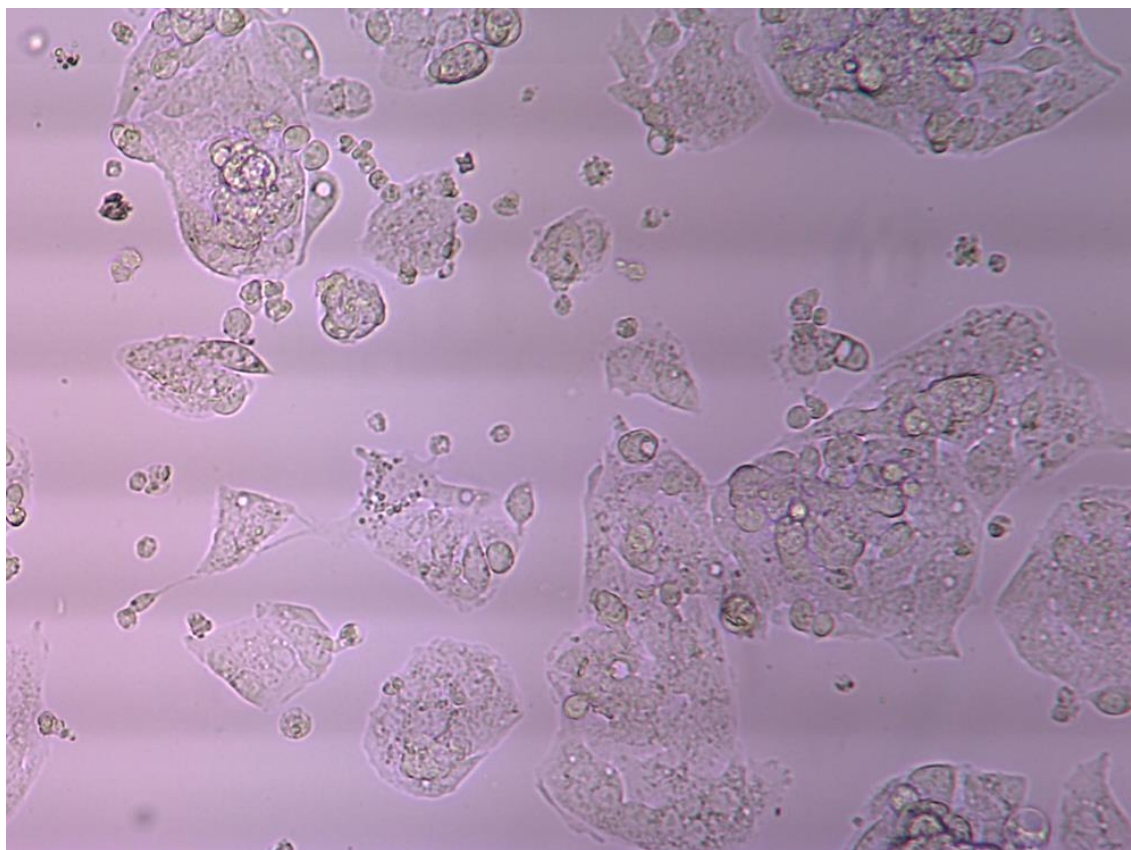


Obrázek 7 Pasážování buněk

3.4 HepG2 buňky

Buňky HepG2 jsou buňky jaterního hepatocelulárního karcinomu lidského původu. Tento karcinom je 5. nejčastější na světě. Tato buněčná kultura roste jako přisedlá, což

znamená, že buňky rostou přisedlé ke dnu kultivační lahve. HepG2 často tvoří shluky buněk. Jejich PDT je obvykle 2 až 3 dny, takže se u nich doporučuje pasážování jednou za týden. Kultivují se v médiu DMEM, do kterého se ještě přidává 1 ml Primocinu, což je antibiotikum, aby se u buněk zabránilo růstu choroboplodných zárodků, a 5 ml L-glutaminu pro jejich lepší růst.



Obrázek 8 *HepG2* buňky

3.5 Testování cytotoxicity MTT Assay

MTT Assay je metoda, která se používá k testování cytotoxicity. Buňky jsou ve své exponenciální fázi růstu vystaveny cytotoxické látce. Délka této expozice je dána jednak časem, který je potřebný k maximálnímu poškození buněk, a také stabilitou cytotoxické látky. Poté, co se testovaná cytotoxická látka odstraní, se nechají buňky proliferovat po dobu 2- 3 PDTs. To zapříčiní, že je poté možné odlišit buňky, které jsou živé a schopné proliferovat, a buňky, které přežily, ale již nejsou schopné proliferace. Počet živých buněk se následně zjistí po přidání MTT. MTT- formazan je rozpuštěn

v DMSO a glycinovém pufru, který fialově zabarví roztok dle toho, kolik živých buněk v dané jamce je. Toto je změřeno na spektrofotometru. Spektrofotometr měří na základě pohlcování světla o různých vlnových délek spektra. Světlo, které je vyzařováno prochází roztok, kde je více či méně pohlcováno a následně dopadá na detektor, který porovnává intenzitu záření vysílaného světla a intenzitu záření dopadajícího světla.

3.5.1 Průběh MTT Assay

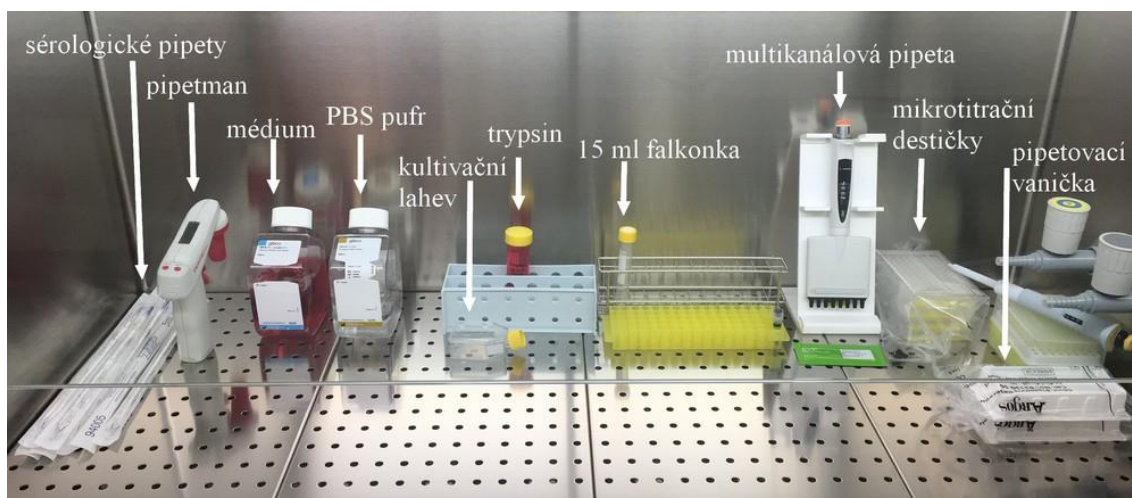
3.5.1.1 Nasazení buněk

Do laminárního boxu si připravíme pipetovací nástavec, sérologické pipety, stojánky, 15 ml falkonku, multikanálovou pipetu, špičky, pipetovací vaničky a mikrotitrační destičku. Do boxu také dáme předem nahřáté médium, trypsin a PBS. Z buněk, které jsou v kultivační lahvi odsajeme 5 ml pipetou médium a přidáme k nim 5 ml PBS. Tím dojde k oplachu buněk. Pufr PBS následně celý odpipetujeme a k buňkám dáme 1 ml trypsinu. Takto je vložíme zpět do inkubátoru na 5 minut, kdy dojde k odlepení buněk od dna kultivační lahve. Po uplynutí této doby přidáme do kultivační lahve 4 ml média. Celý obsah důkladně propipetujeme.

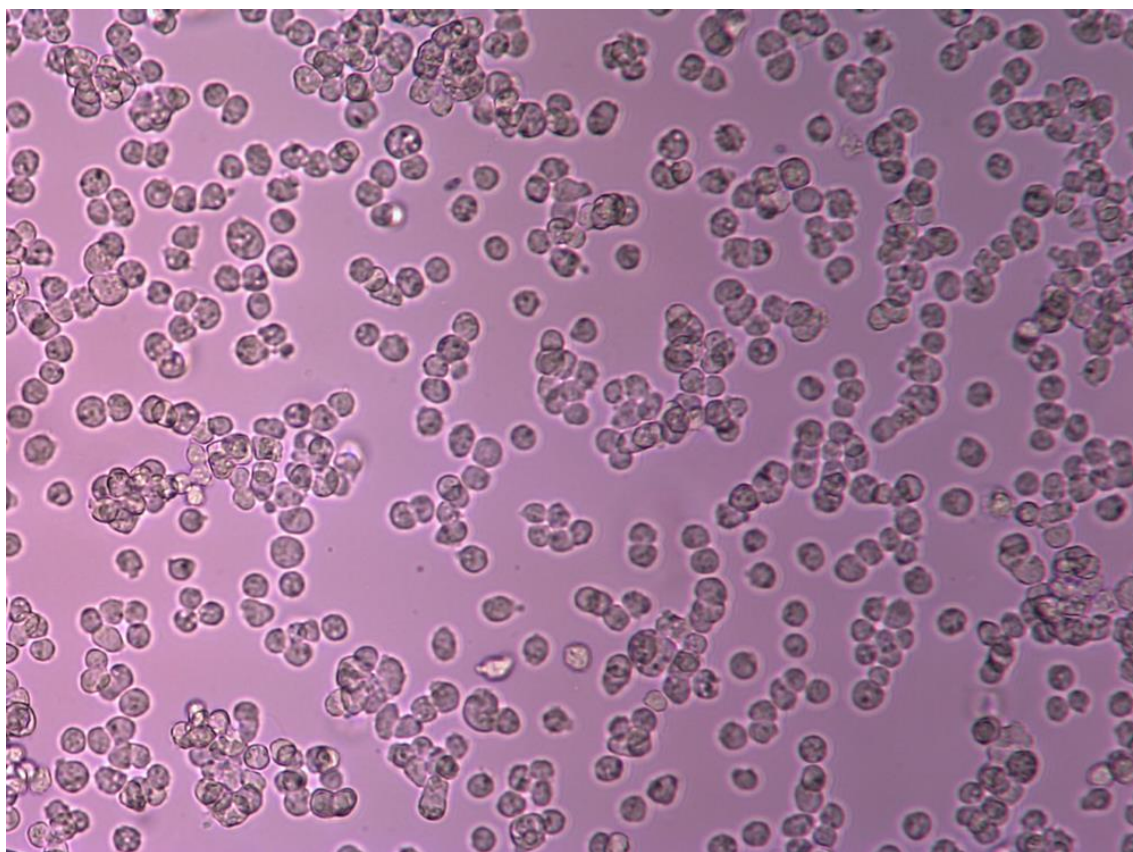
Z buněčné suspenze odpipetujeme 10 μ l do sklíčka na počítání buněk. Zbylé buňky s médiem přepipetujeme do falkonky a dáme do centrifugy, kterou nastavíme na 400 g a 5 minut, aby buňky vytvořily na dně falkonky peletu. Dle výsledku, který nám vyšel při počítání buněk, je následně naředíme. V našem případě potřebujeme finální objem 40 ml buněčné suspenze a koncentraci $0,1 \cdot 10^6$ buněk/ ml. Celkový počet buněk nám vyšel $2,4 \cdot 10^6$ buněk/ ml. Proto objem, který jsme odebrali z buněčné suspenze, byl 2 ml pro 2 mikrotitrační destičky. Tento objem odpipetujeme do první pipetovací vaničky a přidáme k němu 50 ml pipetou 38 ml média. Do druhé pipetovací vaničky dáme 7 ml média.

Multikanálovou pipetou napipetujeme 200 μ l suspenze do všech jamek v centrálních 10 sloupcích destičky. Začneme tedy sloupcem 2 a pokračujeme až do sloupce 10. Multikanálovou pipetou pipetujeme vždy celý jeden sloupec najednou, přičemž není nutné měnit špičky po každém sloupci. Dále napipetujeme 200 μ l média do sloupců 1 a 12. Sloupec 1 pak slouží jako „blank“ pro spektrofotometr. Sloupec 12 pomáhá

udržovat humiditu pro sloupec 11. Mikrotitrační destičku vložíme do inkubátoru, kde necháme buňky rozrůstat po dobu 48 hodin.



Obrázek 9 *Nasazení buněk pro testování cytotoxicity*

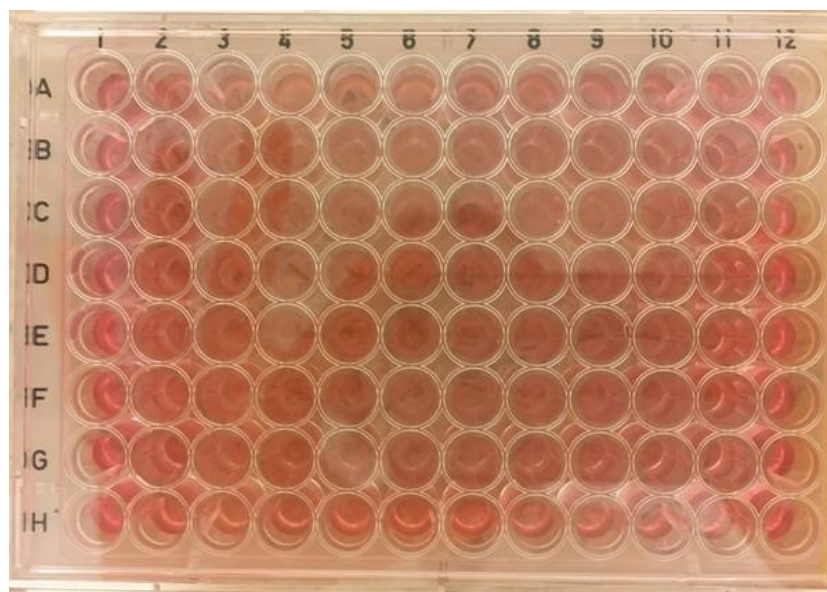


Obrázek 10 *Nasazené buňky HepG2*

3.5.1.2 Přidání cytotoxické látky

Do laminárního boxu si připravíme pipetovací nástavec, sérologické pipety, falkonku, stojánek, multikanálovou pipetu, špičky, 10x pipetovací vaničky a fix na popsání vaniček. Dále dáme do boxu předem nahřáté médium a látku testovanou na cytotoxicitu. Nejprve si připravíme koncentrační řadu s cytotoxickou látkou. Popíšeme si 8 vaniček číslly 1- 8. V první pipetovací vaničce je koncentrace nejvyšší, v osmé nejnižší. Nejvyšší koncentraci jsme zvolili jako 5% roztok testované cytotoxické látky s médiem o celkovém objemu 2 ml. Do zbylých vaniček 2- 8 napipetujeme 1,6 ml média. Z první pipetovací vaničky odebereme multikanálovou pipetou 400 μ l roztoku o největší koncentraci a přepipetujeme ho do druhé vaničky, důkladně promísíme s médiem, aby byl roztok co nejvíce homogenní. Z druhé pipetovací vaničky odebereme 400 μ l a přepipetujeme do třetí vaničky. Takto to provádíme až do vaničky s číslem 8, kde je koncentrace nejnižší. Každý nový roztok je 5x zředěný, odebíráme vždy tedy 400 μ l roztoku, který se přidává k 1,6 ml média. Když máme koncentrační řadu hotovou, přidáme ještě do nové pipetovací vaničky 5 ml čistého kultivačního média. Poslední 10. pipetovací vanička slouží jako odpadní.

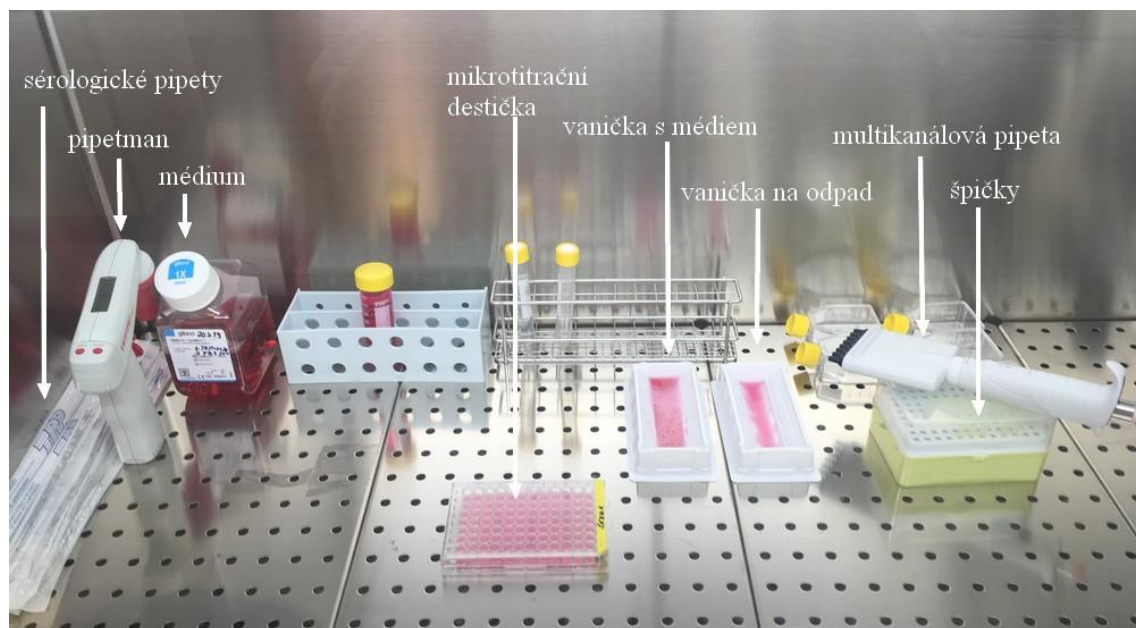
Vyndáme mikrotitrační destičku z inkubátoru a postupně multikanálovou pipetou odsáváme médium ze sloupců 2- 11. Odsáté médium přepipetujeme do vaničky na odpad. Do sloupců 2 a 11 přidáme multikanálovou pipetou 200 μ l čistého kultivačního média. Budou pak sloužit jako pozitivní kontrola. Do zbylých sloupců 3- 10 postupně napipetujeme 200 μ l roztoky z koncentrační řady. Ve sloupci 3 je koncentrace nejvyšší, ve sloupci 10 je koncentrace nejnižší. Po každém sloupci je nutno měnit na multikanálové pipetě špičky, aby nedošlo k mísení roztoků. Následně mikrotitrační destičku uložíme do inkubátoru na 24 hodin. To samé opakujeme i pro druhou destičku.



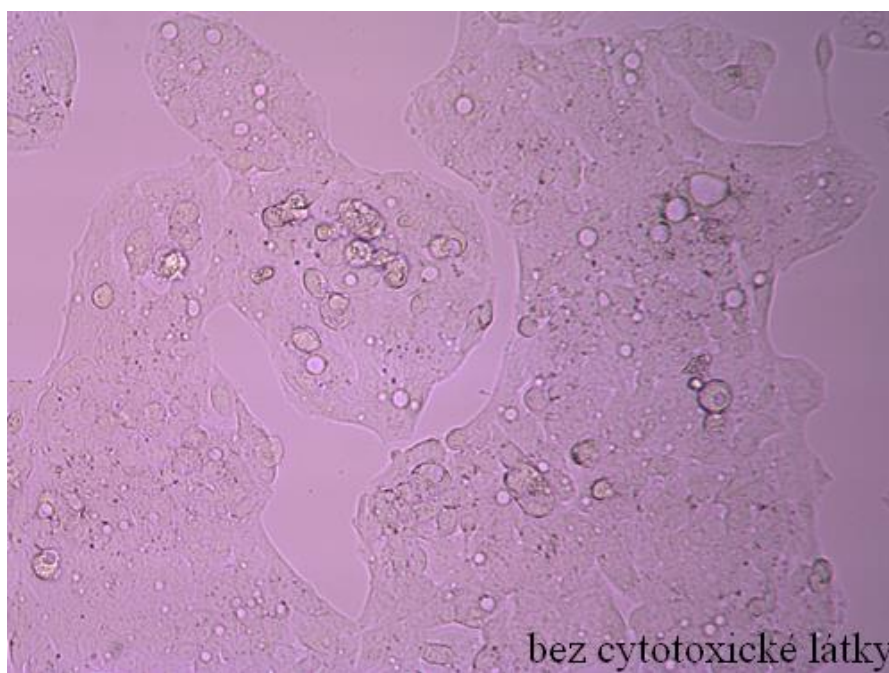
Obrázek 11 Mikrotitrační destička s buňkami a testovanou cytotoxickou látkou

3.5.1.3 Nárůst buněk

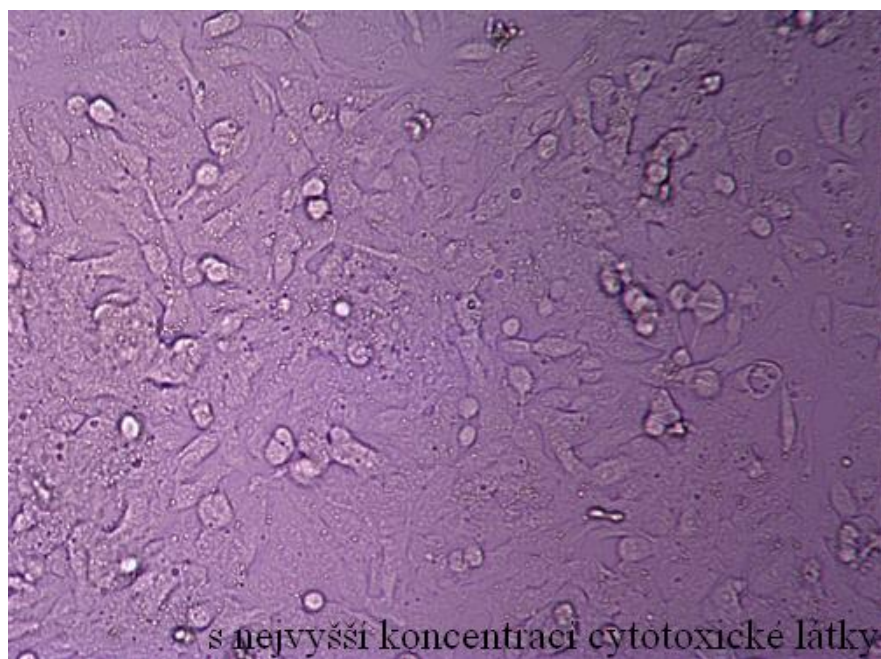
Do laminárního boxu si připravíme pipetovací, nástavec, sérologické pipety, multikanálovou pipetu, špičky, 2x pipetovací vaničky a předem nahřáté médium. Obě mikrotitrační destičky vyndáme z inkubátoru. Do první pipetovací vaničky si přepipetujeme 30 ml média. Tento objem je pro obě dvě destičky. Poté ze sloupců 3-10, kde byla testovaná cytotoxická látka, odsajeme multikanálovou pipetou roztoky média s cytotoxickou látkou. Tyto roztoky pipetujeme do vaničky na odpad. Po každém sloupci je nutné měnit špičky na multikanálové pipetě. Do sloupců 3-10 přidáme 200 μ l čerstvého média, přičemž není nutné měnit špičky. Obě destičky uložíme do inkubátoru na 24 hodin, aby se buňky rozrostly.



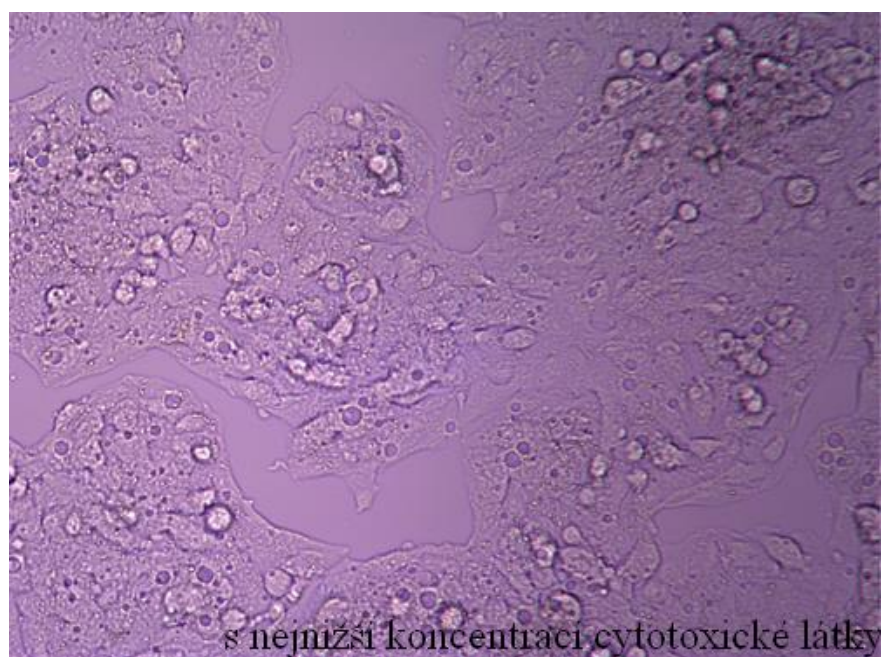
Obrázek 12 *Výměna média pro nárůst buněk*



Obrázek 13 *Buňky HepG2 bez cytotoxické látky*



Obrázek 14 Buňky HepG2 s nejvyšší koncentrací cytotoxické látky



Obrázek 15 Buňky HepG2 s nejnižší koncentrací cytotoxické látky

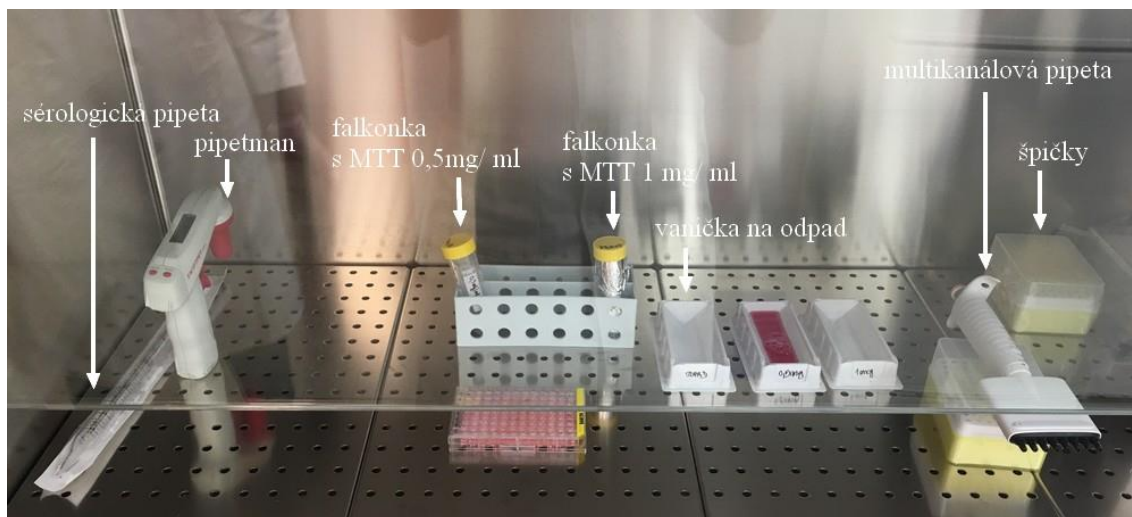
3.5.1.4 Přidání MTT

Do laminárního boxu si připravíme pipetovací nástavec, sérologické pipety, multikanálovou pipetu, špičky, falkonku, 3x pipetovací vaničky a předem nahřáté médium. Dále je potřeba laboratorní váha a vortex. MTT je látka, která je nejprve v podobě žlutých krystalků, které se pak přemění na nerozpustný fialový formazan,

který se dostane do mitochondrií buněk. Po přidání DMSO a glycinového pufru se barvivo uvolní a rozpustí. Čím více je pak živých buněk, tím více se je roztok tmavší, což se pak spektrofotometricky detekuje.

Nejprve si připravíme roztok s MTT, s tím, že jsme zvolili dvě různé koncentrace. První koncentrace je 1 mg MTT na 1 ml, navážili jsme tedy 34 mg MTT, který se rozpustí ve 34 ml média. Druhá koncentrace je 0,5 mg MTT na 1 ml, navážili jsme tedy 16 mg MTT, který se rozpustí ve 32 ml média. Takto připravené roztoky zvortexujeme, aby došlo k co největšímu rozpuštění žlutých krystalků MTT. Falkonky s roztoky vložíme do laminárního boxu, ve kterém pracujeme se zhasnutým světlem, jelikož MTT je citlivé na světlo.

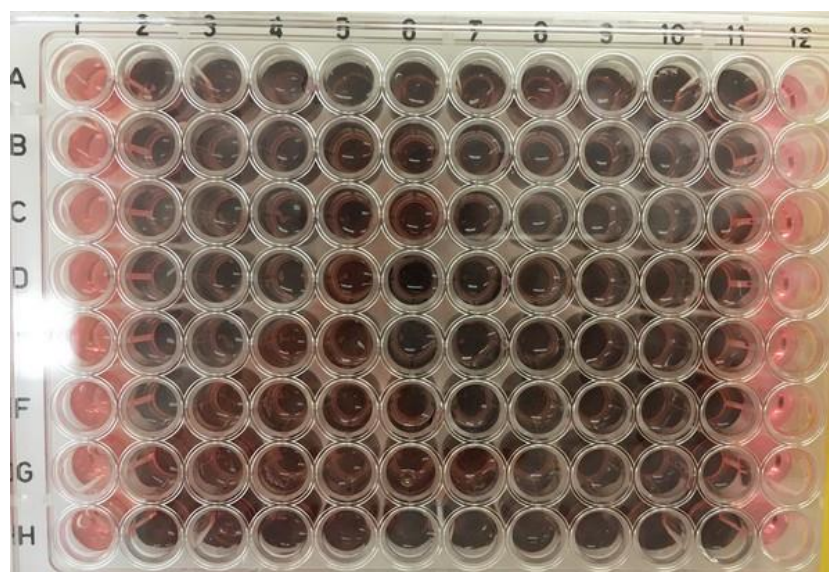
Každý roztok zvlášť přepipetujeme do pipetovací vaničky, nerozpuštěné krystalky nenasáváme. Z mikrotitrační destičky ze sloupců 1- 11 odsajeme multikanálovou pipetou staré médium do vaničky na odpad. Není nutné u každého sloupce měnit špičky. Poté do sloupců 1- 11 přidáme multikanálovou pipetou 250 μ l roztoku média s MTT, kdy opět není nutné měnit špičky. Do první destičky přidáváme roztok o koncentraci 0,5 mg MTT na 1 ml a do druhé destičky roztok o koncentraci 1 mg MTT na 1 ml. Obě destičky zabalíme do alobalu, jelikož je MTT citlivé na světlo, a vložíme do inkubátoru na 5 hodin.



Obrázek 16 Přidání MTT

Mezitím si připravíme 0,1M glycinový pufr s pH 10,5. Smícháme 0,1M glycin s 0,1M NaCl, pH měříme na pH metru. Do laminárního boxu si připravíme DMSO, glycinový pufr, pipetovací nástavec, sérologické pipety, 3x pipetovací vaničky,

multikanálovou pipetu a špičky. Box stále necháváme zhasnutý. Do první pipetovací vaničky napipetujeme 40 ml DMSO, což je objem pro obě mikrotitrační destičky. Do druhé vaničky si napipetujeme 10 ml glycinového pufru. Vyndáme obě destičky z inkubátoru. Ze sloupců 1- 11 odsajeme multikanálovou pipetou roztok média s MTT do vaničky na odpad. Po každém sloupci je nutné měnit špičky. Do sloupců 1- 11 napipetujeme 200 μ l DMSO a 25 μ l glycinového pufru. Přidáním DMSO se rozpustí zbývající krystalky MTT, které jsou v buňkách. Ihned poté měříme destičky na spektrofotometru při dvou vlnových délkách 495 nm a 620 nm.



Obrázek 17 Mikrotitrační destička před měřením na spektrofotometru

3.5.2 Výsledky a vyhodnocení dat

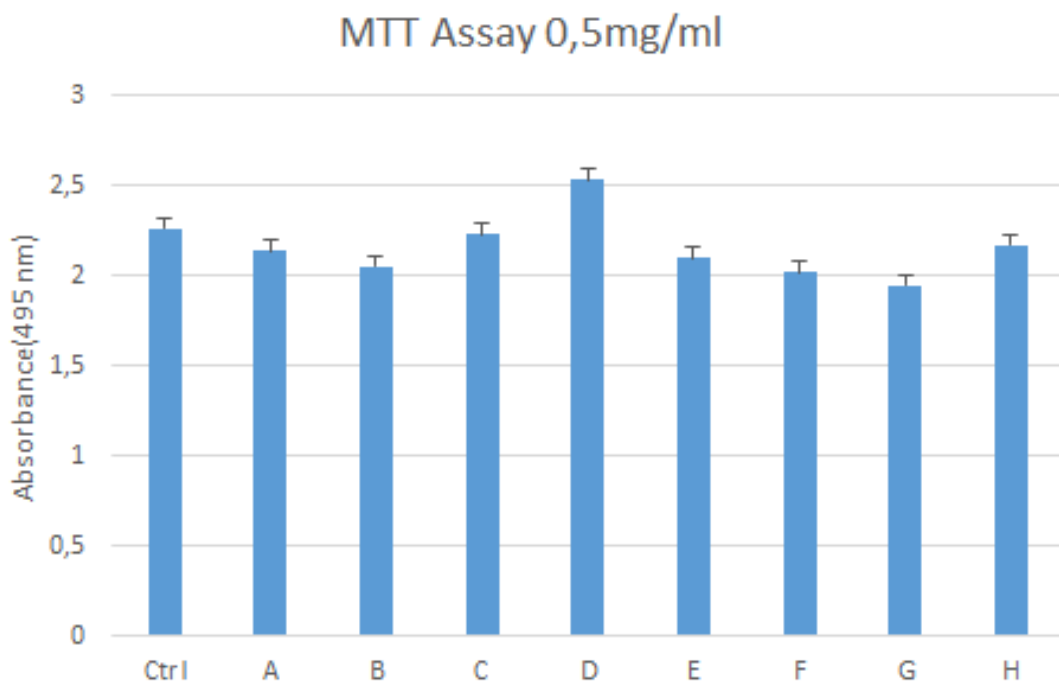
Při měření na spektrofotometru je sloupec 1 použit jako negativní kontrola blank a sloupce 2 a 11 jako pozitivní kontrola. S tím, že ve sloupcích 1 a 12 nejsou buňky a ve sloupcích 2 a 11 buňky jsou, ale nebyla k nim přidána cytotoxická látka. Po změření na spektrofotometru nám je vygenerována tabulka, která má stejné parametry jako mikrotitrační destička. Má tedy 8 řádků a 12 sloupců.

Naměřená data v excelové tabulce bez průměrné hodnoty blanku zprůměrujeme. Průměr děláme u jednotlivých sloupců. Z těchto hodnot pak vytvoříme sloupcový graf. Porovnáváme sloupec pozitivní kontroly Ctrl se sloupci, které odpovídají jednotlivým koncentracím. Negativní kontrolu do grafu nedáváme, stejně tak ani sloupec 12, který je

bez buněk. Hodnotu negativní kontroly blank pouze odečítáme od hodnot ve sloupcích, které odpovídají jednotlivým koncentracím.

Tabulka 1 Hodnoty naměřené při 495 nm s MTT 0,5 mg/ml a jejich zpracování

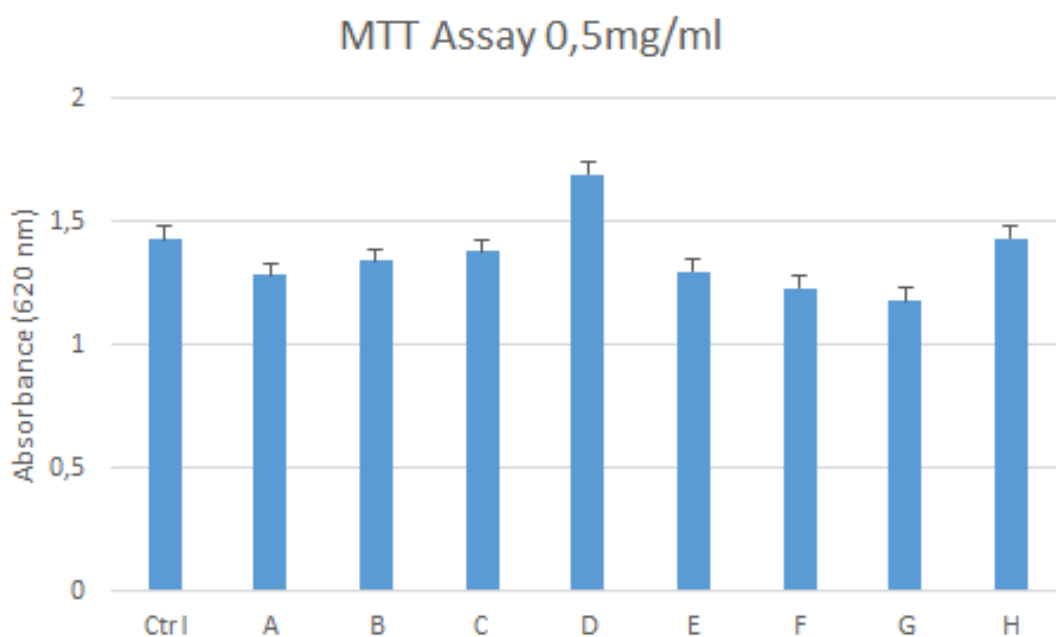
BLANK	CTRL 1	A	B	C	D	E	F	G	H	CTRL 2
0,0724	1,9898	1,5946	1,5404	2,3406	2,5472	1,7262	1,5283	1,8534	2,1884	2,357
0,0709	1,9574	2,4727	2,7231	2,3304	2,2207	1,8255	1,8574	2,0528	2,4156	2,2359
0,0665	1,957	2,5498	2,0989	2,2281	2,5584	2,6168	1,4572	1,9994	2,5018	2,3832
0,0701	1,8954	2,6237	2,311	2,0224	1,4541	2,3782	3,01	1,7579	2,0696	2,9082
0,072	2,5056	2,1135	2,2417	2,6857	2,0215	2,0267	2,4952	2,3633	2,0446	2,5136
0,0674	2,2675	2,0826	2,269	2,2307	2,8013	2,281	1,9739	1,9283	2,0207	2,4928
0,0685	2,1126	2,0651	1,4062	2,1095	3,6167	2,3523	2,152	2,2069	2,1891	2,3942
0,0616	2,9773	2,1138	2,3172	2,4137	3,5794	2,082	2,1827	1,9255	2,4467	2,2469
Rozdíly										
	1,9174	1,5222	1,468	2,2682	2,4748	1,6538	1,4559	1,781	2,116	2,2846
	1,8865	2,4018	2,6522	2,2595	2,1498	1,7546	1,7865	1,9819	2,3447	2,165
	1,8905	2,4833	2,0324	2,1616	2,4919	2,5503	1,3907	1,9329	2,4353	2,3167
	1,8253	2,5536	2,2409	1,9523	1,384	2,3081	2,9399	1,6878	1,9995	2,8381
	2,4336	2,0415	2,1697	2,6137	1,9495	1,9547	2,4232	2,2913	1,9726	2,4416
	2,2001	2,0152	2,2016	2,1633	2,7339	2,2136	1,9065	1,8609	1,9533	2,4254
	2,0441	1,9966	1,3377	2,041	3,5482	2,2838	2,0835	2,1384	2,1206	2,3257
	2,9157	2,0522	2,2556	2,3521	3,5178	2,0204	2,1211	1,8639	2,3851	2,1853
Average	2,13915	2,1333	2,044763	2,226463	2,531238	2,092413	2,013413	1,942263	2,165888	2,3728
	Ctrl	A	B	C	D	E	F	G	H	
	2,255975	2,1333	2,044763	2,226463	2,531238	2,092413	2,013413	1,942263	2,165888	



Graf 1 Výsledky MTT Assay při 495 nm s MTT 0,5 mg/ml

Tabulka 2 Hodnoty naměřené při 620 nm s MTT 0,5 mg/ml a jejich zpracování

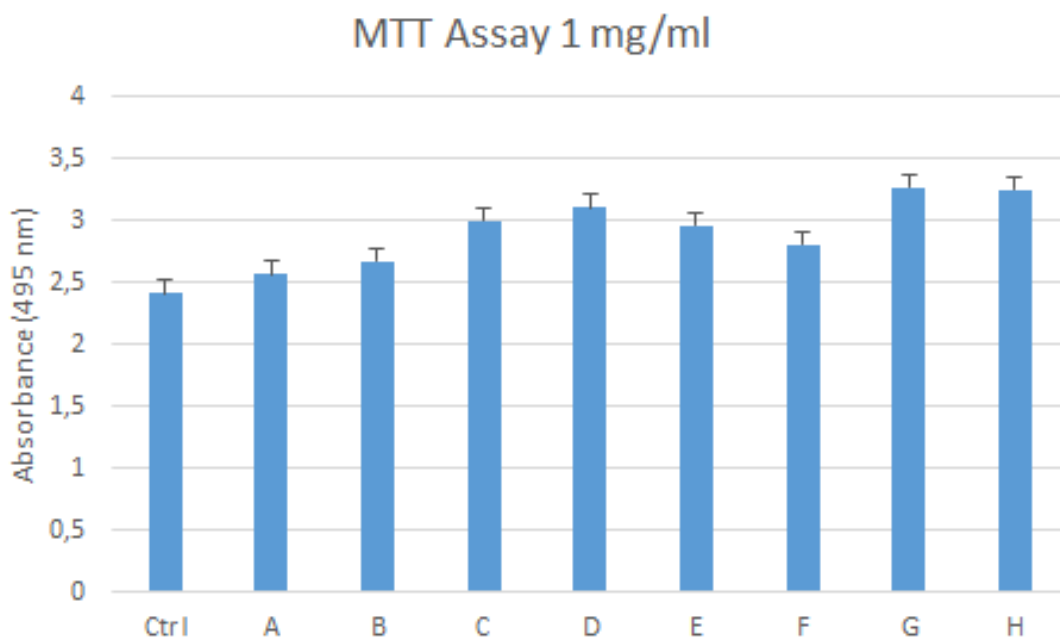
BLANK	CTRL 1	A	B	C	D	E	F	G	H	CTRL 2	
0,059	1,3241	1,0462	1,0086	1,504	1,7227	1,2389	1,1295	1,2019	1,4279	1,5464	0,0464
0,0572	1,3081	1,4118	1,6403	1,4151	1,3413	1,3372	1,1645	1,3442	1,4803	1,4055	0,0499
0,0551	1,2476	1,4562	1,3397	1,4968	1,746	1,4181	1,2603	1,1432	1,5485	1,5905	0,0436
0,0577	1,2431	1,6022	1,3136	1,2555	1,451	1,4498	1,3731	1,1779	1,4029	1,4866	0,0469
0,0582	1,5169	1,2861	1,2626	1,5503	1,4431	1,3801	1,3417	1,3194	1,3255	1,6182	0,0522
0,0556	1,4331	1,3248	1,6078	1,327	1,7245	1,2778	1,2362	1,1616	1,4506	1,5707	0,0472
0,0588	1,5392	1,278	1,5975	1,5077	2,2255	1,4376	1,3394	1,2767	1,7003	1,5033	0,0454
0,0529	1,8624	1,2731	1,3763	1,3898	2,2961	1,2537	1,4236	1,2314	1,5448	1,5095	0,0504
Rozdíly											
	1,2651	0,9872	0,9496	1,445	1,6637	1,1799	1,0705	1,1429	1,3689	1,4874	
	1,2509	1,3546	1,5831	1,3579	1,2841	1,28	1,1073	1,287	1,4231	1,3483	
	1,1925	1,4011	1,2846	1,4417	1,6909	1,363	1,2052	1,0881	1,4934	1,5354	
	1,1854	1,5445	1,2559	1,1978	1,3933	1,3921	1,3154	1,1202	1,3452	1,4289	
	1,4587	1,2279	1,2044	1,4921	1,3849	1,3219	1,2835	1,2612	1,2673	1,56	
	1,3775	1,2692	1,5522	1,2714	1,6689	1,2222	1,1806	1,106	1,395	1,5151	
	1,4804	1,2192	1,5387	1,4489	2,1667	1,3788	1,2806	1,2179	1,6415	1,4445	
	1,8095	1,2202	1,3234	1,3369	2,2432	1,2008	1,3707	1,1785	1,4919	1,4566	
Average	1,3775	1,277988	1,336488	1,373963	1,686963	1,292338	1,226725	1,175225	1,428288	1,472025	
	Ctrl	A	B	C	D	E	F	G	H		
	1,424763	1,277988	1,336488	1,373963	1,686963	1,292338	1,226725	1,175225	1,428288		



Graf 2 Výsledky MTT Assay při 620 nm s MTT 0,5 mg/ml

Tabulka 3 Hodnoty naměřené při 495 nm s MTT 1 mg/ml a jejich zpracování

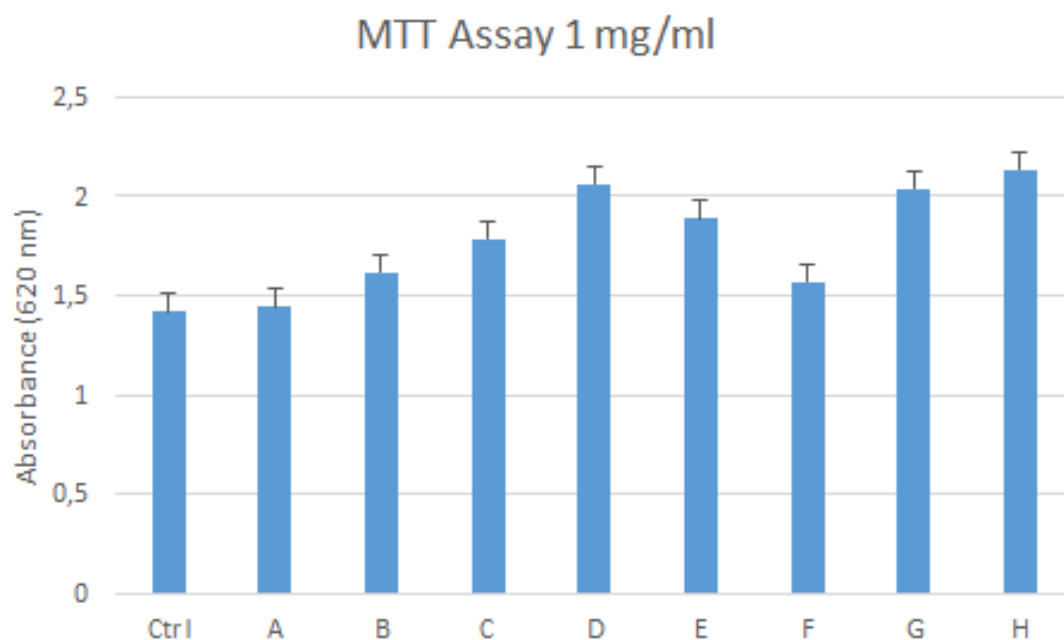
BLANK	CTRL 1	A	B	C	D	E	F	G	H	CTRL 2
0,0571	2,47	2,4375	2,3598	2,7253	2,4923	2,6534	3,2068	3,169	2,5434	1,9686
0,0515	2,2337	1,8803	2,4278	2,7632	3,2038	2,8085	2,4918	3,4435	Overflow	2,6254
0,0531	2,7118	2,9377	3,436	3,2899	3,5329	Overflow	3,2319	3,892	3,9589	2,2513
0,0547	2,0687	1,6207	2,7121	3,0009	3,6194	3,1205	3,1536	3,5292	3,2562	2,8195
0,0497	2,2833	3,4922	3,1316	Overflow	3,7684	3,4674	2,2313	3,4216	Overflow	2,0599
0,0529	2,4473	2,6452	2,5953	3,6937	3,1331	3,4129	2,5504	3,6212	Overflow	2,2742
0,0463	3,7758	3,1502	2,5021	2,8006	2,9239	3,0225	3,2249	3,0398	3,9519	2,2706
0,0596	2,5816	2,7515	2,5724	3,0344	2,5724	2,5633	2,7656	2,4024	2,7753	2,5019
Rozdíly										
	2,4129	2,3804	2,3027	2,6682	2,4352	2,5963	3,1497	3,1119	2,4863	1,9115
	2,1822	1,8288	2,3763	2,7117	3,1523	2,757	2,4403	3,392		2,5739
	2,6587	2,8846	3,3829	3,2368	3,4798		3,1788	3,8389	3,9058	2,1982
	2,014	1,566	2,6574	2,9462	3,5647	3,0658	3,0989	3,4745	3,2015	2,7648
	2,2336	3,4425	3,0819		3,7187	3,4177	2,1816	3,3719		2,0102
	2,3944	2,5923	2,5424	3,6408	3,0802	3,36	2,4975	3,5683		2,2213
	3,7295	3,1039	2,4558	2,7543	2,8776	2,9762	3,1786	2,9935	3,9056	2,2243
	2,522	2,6919	2,5128	2,9748	2,5128	2,5037	2,706	2,3428	2,7157	2,4423
Average	2,518413	2,5613	2,664025	2,9904	3,102663	2,953814	2,803925	3,261725	3,24298	2,293313
	Ctrl	A	B	C	D	E	F	G	H	
	2,405863	2,5613	2,664025	2,9904	3,102663	2,953814	2,803925	3,261725	3,24298	



Graf 3 Výsledky MTT Assay při 495 nm s MTT 1 mg/ml

Tabulka 4 Hodnoty naměřené při 620 nm s MTT 1 mg/ml a jejich zpracování

BLANK	CTRL 1	A	B	C	D	E	F	G	H	CTRL 2
0,0502	1,7196	1,3087	1,2107	1,7192	1,6712	1,7018	1,4117	1,6469	1,6563	1,172
0,0465	1,4003	1,2299	1,5894	1,6646	2,5097	1,616	1,527	2,1402	2,0179	1,6673
0,0474	1,3102	1,6228	2,2488	1,7712	2,6256	2,3796	1,9164	2,5441	2,3027	1,3684
0,0488	1,2618	1,0948	1,492	1,4259	2,4405	1,6293	1,6005	2,0672	2,3845	1,8189
0,0454	1,303	1,7146	2,2203	2,8355	2,5827	2,2938	1,413	2,4344	2,3143	1,2089
0,0478	1,3622	1,6432	1,6546	2,0305	1,8003	2,1506	1,5181	2,201	2,9209	1,3751
0,0437	2,1339	2,0781	1,5233	1,798	1,7392	2,0631	1,834	1,9596	2,366	1,4014
0,0523	1,423	1,2385	1,391	1,4402	1,508	1,6454	1,6941	1,6965	1,5	1,5705
Rozdíly										
	1,6694	1,2585	1,1605	1,669	1,621	1,6516	1,3615	1,5967	1,6061	1,1218
	1,3538	1,1834	1,5429	1,6181	2,4632	1,5695	1,4805	2,0937	1,9714	1,6208
	1,2628	1,5754	2,2014	1,7238	2,5782	2,3322	1,869	2,4967	2,2553	1,321
	1,213	1,046	1,4432	1,3771	2,3917	1,5805	1,5517	2,0184	2,3357	1,7701
	1,2576	1,6692	2,1749	2,7901	2,5373	2,2484	1,3676	2,389	2,2689	1,1635
	1,3144	1,5954	1,6068	1,9827	1,7525	2,1028	1,4703	2,1532	2,8731	1,3273
	2,0902	2,0344	1,4796	1,7543	1,6955	2,0194	1,7903	1,9159	2,3223	1,3577
	1,3707	1,1862	1,3387	1,3879	1,4557	1,5931	1,6418	1,6442	1,4477	1,5182
Average	1,441488	1,443563	1,6185	1,787875	2,061888	1,887188	1,566588	2,038475	2,135063	1,40005
	Ctrl	A	B	C	D	E	F	G	H	
	1,420769	1,443563	1,6185	1,787875	2,061888	1,887188	1,566588	2,038475	2,135063	



Graf 4 Výsledky MTT Assay při 620 nm s MTT 1 mg/ml

3.6 Měření buněk na magnetické rezonanci

Ztrypsinizujeme buňky v několika kultivačních lahvích a následně buněčné suspenze přepipetujeme do 50 ml falkonky, kterou dáme na 50 minut do centrifugy na 400 g, aby se na dně falkonky vytvořila peleta. Mezitím si z 10 μl buněčné suspenze spočítáme počet buněk. V našem případě to bylo $23 \cdot 10^6$ buněk/ ml. Měli jsme 7 ml buněčné suspenze, což znamená, že celkový počet buněk byl $161 \cdot 10^6$ buněk.



Obrázek 18 *Peleta buněk HepG2*

Pro měření na MR potřebujeme 8 zkumavek s různým počtem buněk. Nejprve od pelety odsajeme pipetou přebytečné médium a následně jí celou přepipetujeme do 1. zkumavky. Do zkumavek 2- 8 napipetujeme 350 μl čistého média. Z první zkumavky odsajeme 350 μl buněk a dáme je do druhé zkumavky a důkladně propipetujeme. Z druhé zkumavky odebereme 350 μl buněčné suspenze a dáme jí do třetí zkumavky a důkladně propipetujeme. Stejný postup děláme až do 8. zkumavky. Buněčná suspenze je 2x ředěná. Což znamená, že v 1. zkumavce je celkový počet buněk $80 \cdot 10^6$, ve 2. zkumavce je $40 \cdot 10^6$ buněk, ve 3. zkumavce je $20 \cdot 10^6$ buněk, ve 4. zkumavce je $10 \cdot 10^6$ buněk, v 5. zkumavce je $5 \cdot 10^6$ buněk, v 6. zkumavce je $2,5 \cdot 10^6$ buněk, v 7. zkumavce je $1,25 \cdot 10^6$ buněk a v 8. zkumavce je $0,625 \cdot 10^6$ buněk. Všechny zkumavky následně dáme do centrifugy na 3 minuty a 400 g, aby se na jejich dně vytvořila peleta buněk. Ze zkumavek odpipetujeme přebytečné médium, aby v nich zbyly pouze buňky. Kdyby tam médium zůstalo, tak by nám zkreslovalo výsledky na magnetické rezonanci, jelikož i z něj by se naměřil signál. Do další zkumavky si připravíme 5 % roztok s kontrastní

látkou. Do poslední zkumavky dáme pouze destilovanou vodu. Zkumavky umístíme do držáku, označíme je a vložíme do objemové cívky a do magnetické rezonance.



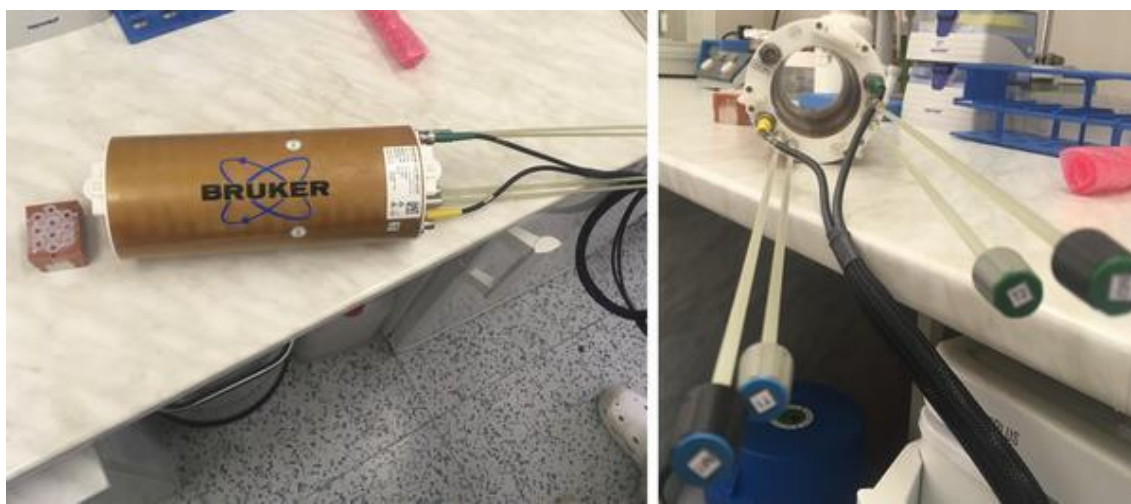
Obrázek 19 *Umístění zkumavek v držáku*



Obrázek 20 *Boční pohled na držák se zkumavkami a zobrazení různě velkých pelet buněk ve zkumavkách*

Pro měření byly použity buňky hepatocelulárního karcinomu HepG2 a kontrastní látka respektive nosič byl glykogen. Glykogen je zásobní polysacharid, který je uložen především v jaterních a svalových buňkách. Může být využit jako teranostická kontrastní látka. To znamená, že se na něj dají chemicky navázat jiné látky, kterými mohou být například léčiva nebo látky pro diagnostické účely.

Měření bylo prováděno v objemové cívce, která na rozdíl od povrchové cívky dokáže pracovat v celém svém objemu a má lepší dosah signálu.



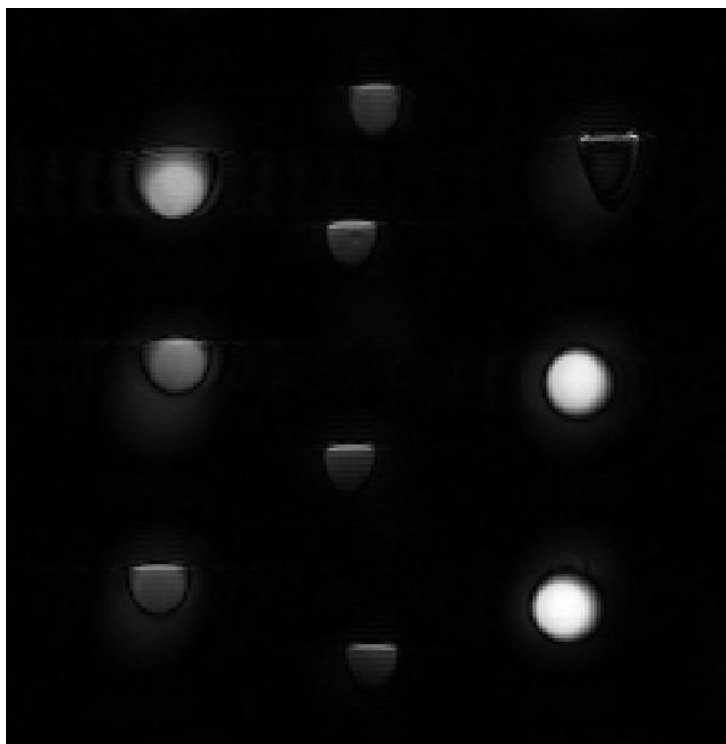
Obrázek 21 *Objemová cívka*

Rozptylová funkce PSF z anglického Point Spread Function má velký význam při získávání obrazu, kdy popisuje světlo, které vzniká v jednotlivých bodech obrazu, který je snímán. Ve vzniklém obraze je pak rozptylová funkce PSF místo každého bodu jako intenzita daného bodu.

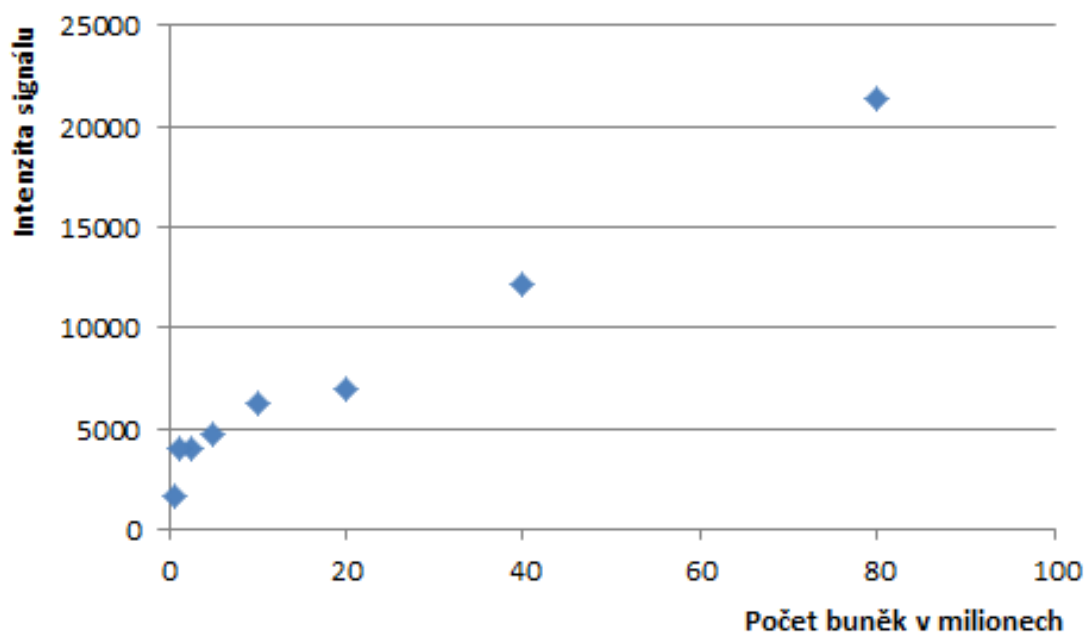
Zkumavky byly měřeny sekvencí s názvem rapid acquisition with a relaxation enhancement multispin echo (RARE) T_2 váženým časem. Šířka vrstvy byla zvolena jako 10 mm s rare faktorem 8 a rare faktorem 1. Snímky byly následně zpracovány v programu ImageJ, kde byla změřena intenzita signálu jednotlivých zkumavek s buňkami a sestrojeny grafy. Druhým grafem je závislost počtu buněk na signal to noise ratio SNR, jehož hodnoty jsme získali ze vztahu

$$SNR = 0,655 \cdot (I / \mu)$$

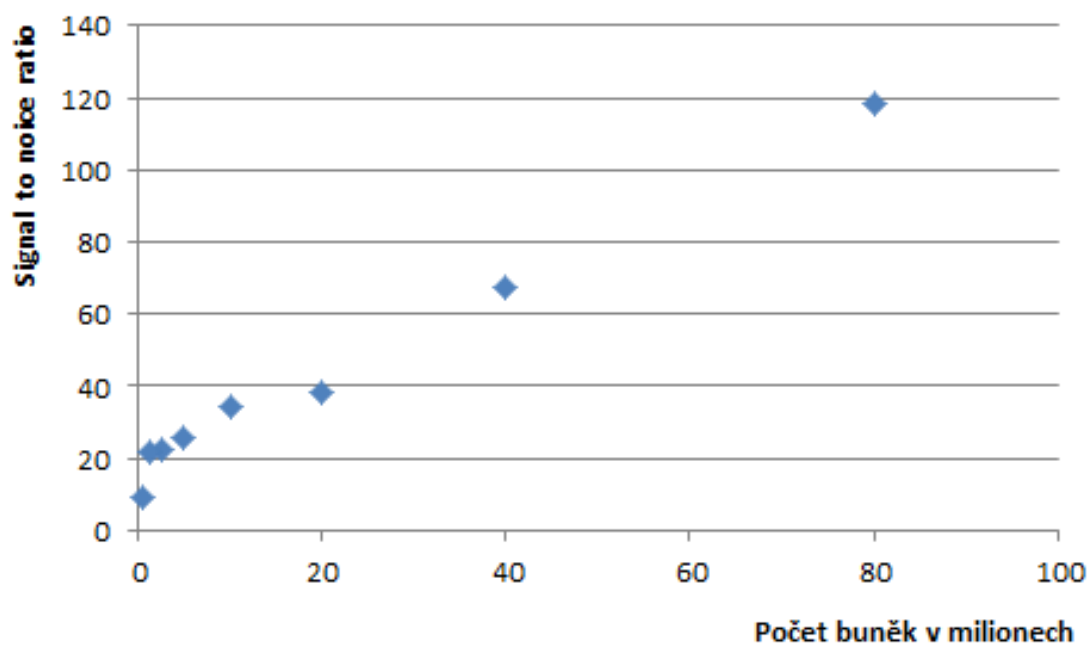
kde I je intenzita signálu a μ je průměrná hodnota směrodatné odchylky šumu.



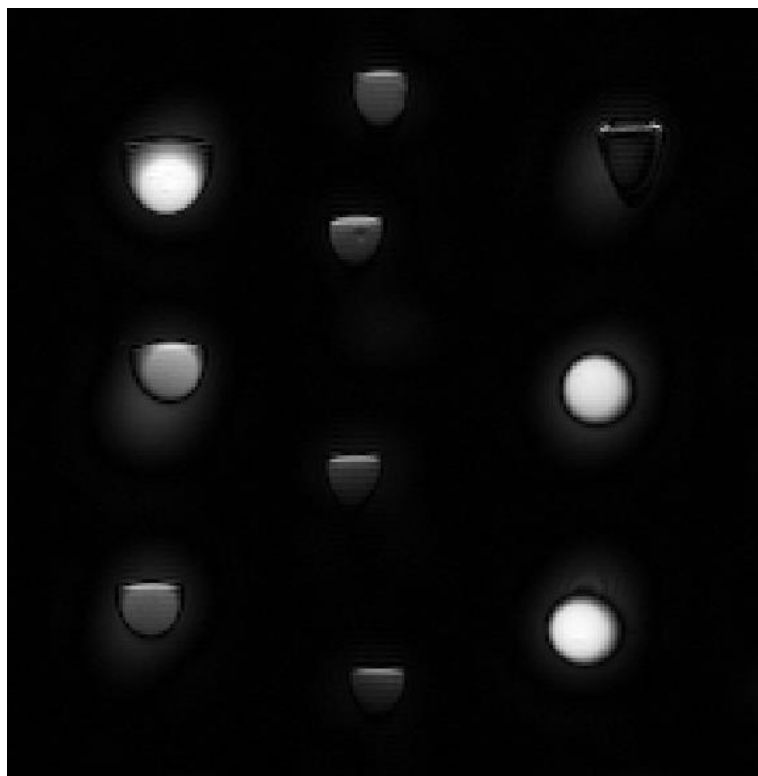
Obrázek 22 Výsledek měření z magnetické rezonance s rare faktorem 8



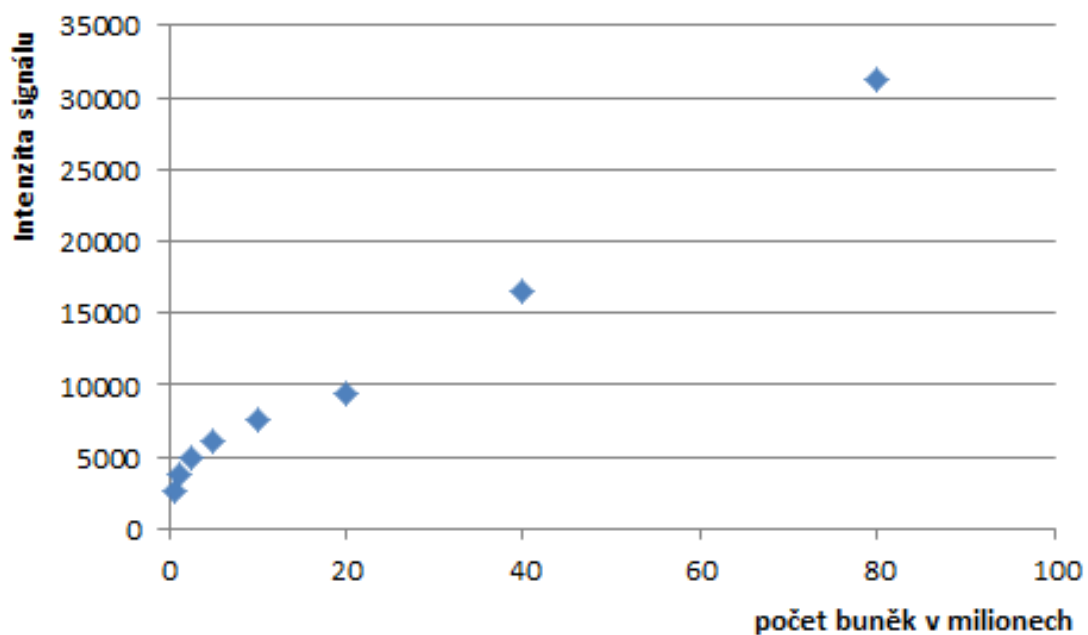
Graf 5 Výsledek měření na magnetické rezonanci s rare faktorem 8



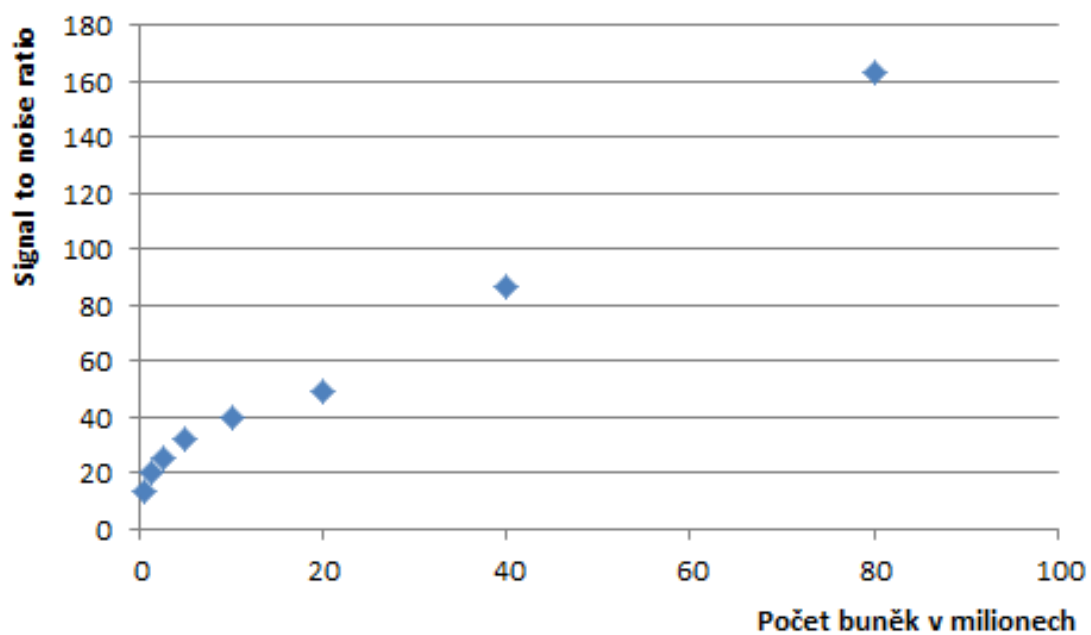
Graf 6 Výsledek měření na magnetické rezonanci s rare faktorem 8 s intenzitou převedenou na SNR



Obrázek 23 Výsledek měření z magnetické rezonance s rare faktorem 1



Graf 7 Výsledek měření na magnetické rezonanci s rare faktorem 1

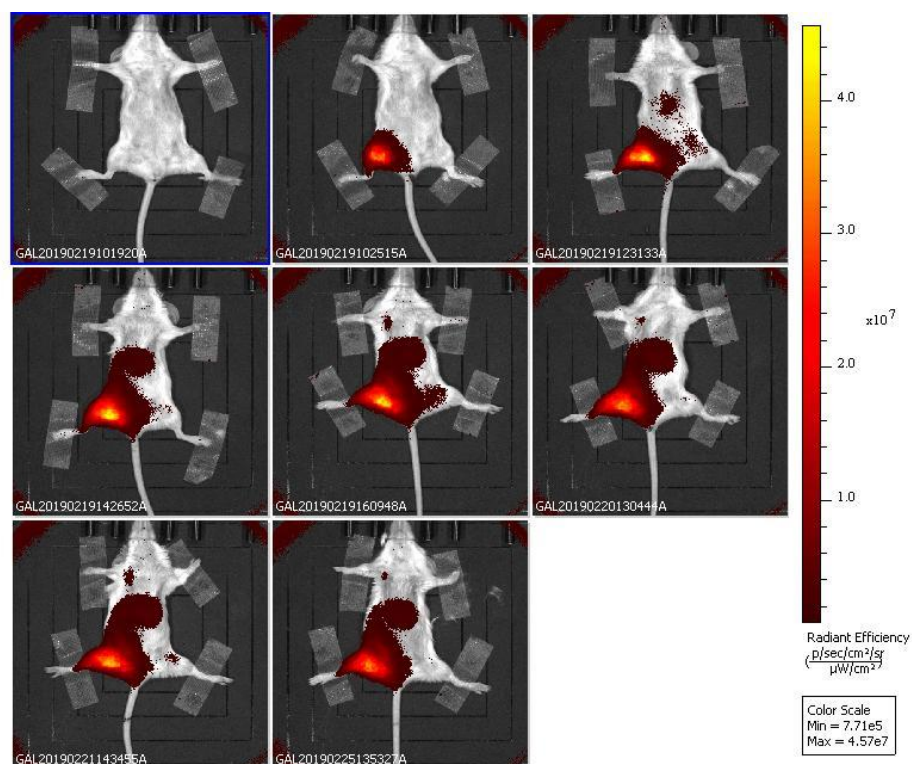


Graf 8 Výsledek měření na magnetické rezonanci s rare faktorem 1 s intenzitou převedenou na SNR

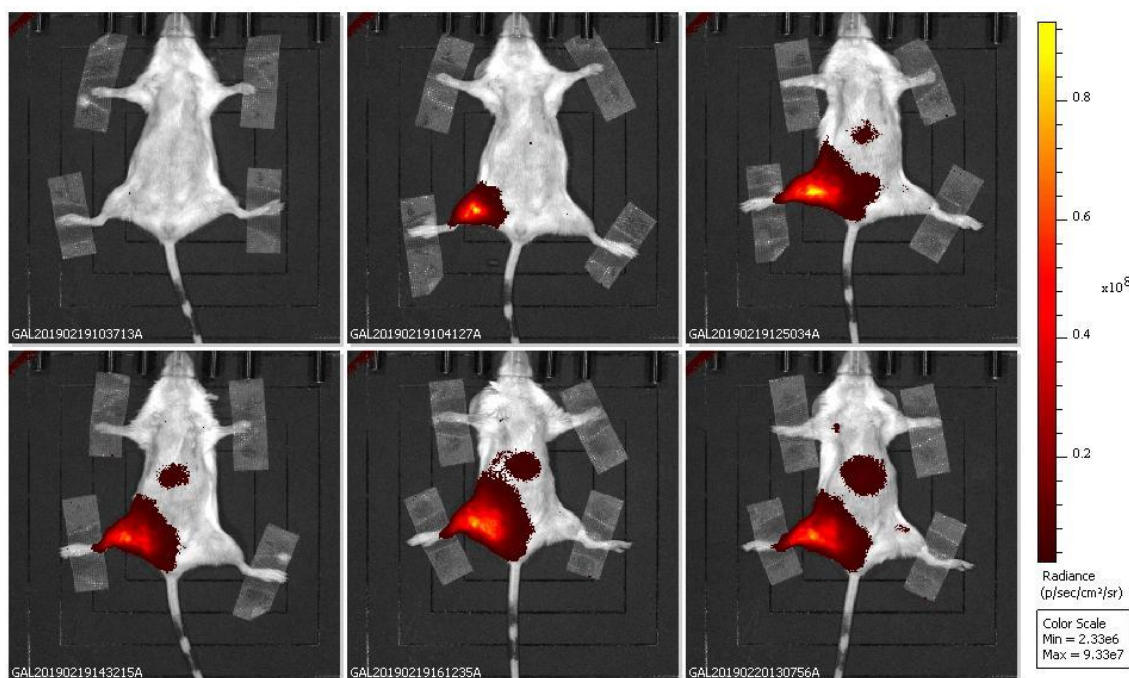
3.7 Fluorescenční měření kontrastní látky

Tento experiment byl prováděn in vivo na dvou laboratorních myších, kterým jsme indukovali buňky 4T1, což jsou buňky prsního karcinomu myšího původu. Poté, co se nádor v myších rozrostl, jsme injekčně aplikovali fluorescenční kontrastní látku k místu nádoru. Jako kontrastní látka byla použita látka na bázi mannanu, která má velmi podobné biochemické vlastnosti jako glykogen a je biokompatibilní, biodegradabilní a netoxická. Myši jsme následně změřili na optickém přístroji IVIS Lumina, kdy jsme měřili fluorescence. IVIS Lumina je přístroj pro optické zobrazování, může zobrazovat fluorescence nebo bioluminiscenci.

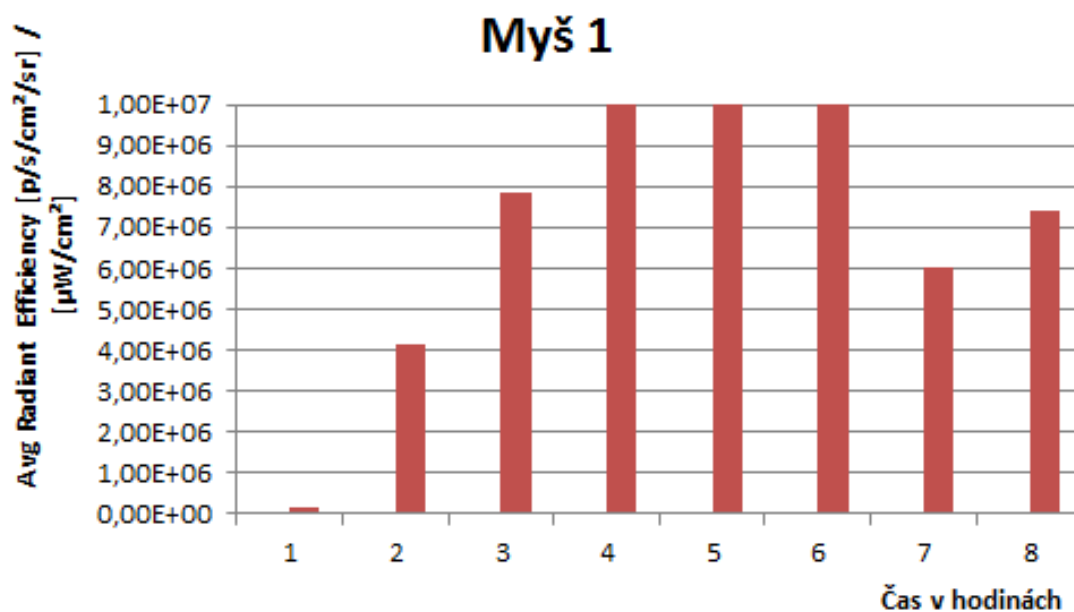
Myši byly změřeny nejprve před podáním kontrastní látky, pak půl hodiny po podání kontrastu, 2 hodiny po podání kontrastu, 4 hodiny po podání kontrastu, 6 hodin po podání kontrastu a 24 hodin po podání kontrastu. První myš byla ještě změřena 48 hodin po podání kontrastu a 6 dní po podání kontrastu. Před každým měřením byla myš uspána inhalací isofluranu.



Obrázek 24 Výsledky fluorescenčního měření pro 1. myš

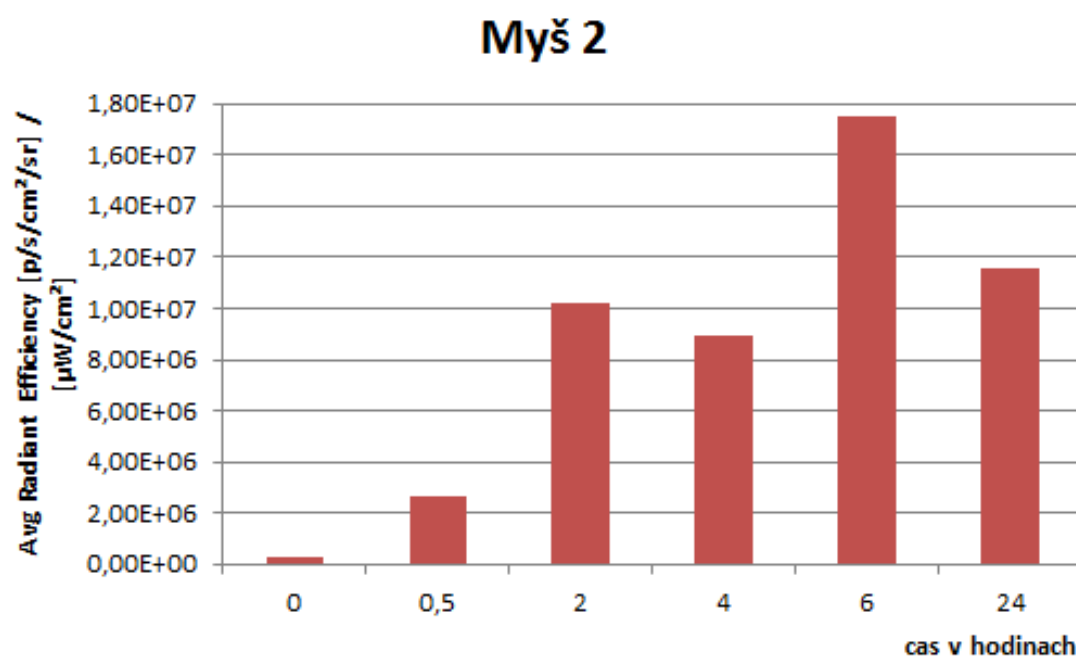


Obrázek 25 Výsledky fluorescenčního měření pro 1. myš



Graf 9 Výsledky fluorescenčního měření pro 1. Myš

Fluorescence je fyzikální jev, kdy látka, která předtím pohltila elektromagnetické záření, vyzařuje světlo. Tím, že látka absorbuje elektromagnetické záření, se dostane do vyšší energetické hladiny. Z té se následně vrací do původní energetické hladiny a přitom vyzařuje fotony.



Graf 10 *Výsledky fluorescenčního měření pro 2. myš*

4 Závěr a doporučení

V této bakalářské práci jsme se snažili osvojit si práci s buněčnými liniemi a měření na magnetické rezonanci. Také jsme si osvojili postupy měření na spektrofotometru a optickém přístroji na fluorescenci.

V teoretické části jsme shrnuli základní informace o magnetické rezonanci, protože tato metoda se bude především využívat v následné diplomové práci. Při sepisování těchto poznatků jsme vycházeli hlavně ze zdrojů odborné literatury.

Praktická část byla rozdělena na více částí. V první části jsme se věnovali samotné práci s buněčnými liniemi, kdy šlo především o to osvojit si základní techniky práce, aby bylo možné provádět následné části výzkumu. Mezi ně patřilo rozmrazování a pasážování buněk.

V druhé části jsme prováděli test cytotoxicity MTT Assay na buňkách hepatocelulárního karcinomu HepG2, kde testovanou látkou byla kontrastní látka glykogen. Zde se nám dle výsledků podařilo prokázat, že glykogen pro buňky toxický není, jelikož hodnoty absorpance byly prakticky totožné ve sloupcích, kde byly pouze buňky bez cytotoxické látky se sloupci, kde byla přidána různá koncentrace cytotoxické látky. To můžeme vidět i z výsledných grafů. Kontrolní sloupec Ctrl, který je jako průměrná hodnota pozitivních kontrol neboli jamek, kde byly pouze buňky bez cytotoxické látky, je s porovnáním sloupců A- H, kde byly různé koncentrace cytotoxické látky, hodnotově stejně velký nebo i menší než hodnoty absorpance ve sloupcích A- H. Z toho vyplývá, že ve sloupcích A- H bylo buď stejně, nebo i více buněk, které byly schopné proliferovat. Výsledek byl totožný pro obě koncentrace přidaného MTT, tedy 0,1 mg MTT/ ml a 0,5 mg MTT/ ml, a i na různých vlnových délkách 495 nm a 620 nm. Můžeme tedy říci, že glykogen pro buňky toxický není, ani v nejvyšší měřené koncentraci 5%.

Ve třetí části jsme se zabývali měřením na magnetické rezonanci, kdy bylo měřeno celkem 10 zkumavek. Ve zkumavkách 1- 8 byly různé počty buněk HepG2, které se řadily takzvanou dvojkovou řadou. První a nejvyšší počet buněk ve zkumavce byl $80 \cdot 10^6$ buněk. V dalších dvou zkumavkách byl 5% roztok glykogenu a destilovaná voda. Vzorky jsme měřili T_2 váženou sekvencí s rare faktorem 8 a rare faktorem 1. Na snímcích z magnetické rezonance je patrné, že s ubývajícím počtem buněk klesá i

intenzita signálu. Naopak 5% roztok glykogenu a destilované vody měli intenzitu signálu téměř totožnou.

Ve čtvrté části jsme provedli měření na optickém přístroji IVIS Lumina, kde jsme měřili fluorescenci. Dvěma laboratorním myším jsme indukovali buňky prsního karcinomu 4T1. Poté jim byla injekčně podána kontrastní látka na bázi mannanu s fluorescenční značkou a byly postupně v časových intervalech měřeny fluorescenčním zobrazováním. První myš byla měřena před podáním kontrastu a pak 30 minut, 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin, 24 hodin, 48 hodin a 6 dní po podání kontrastní látky. Druhá myš byla měřena před podáním kontrastu a pak 30 minut, 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin a 24 hodin po podání kontrastní látky. Ze snímků z fluorescenčního měření je patrné, že se kontrastní látka mannan dostává do jater, sleziny, lymfatických uzlin a nádoru. Čím déle byla myš měřena, tím méně byl fluorescenční signál detekovatelný, nejvyšší hodnota signálu byla okolo 6 hodin po podání kontrastní látky, jak můžeme vidět z výsledných grafů.

V dnešní době se výzkum a věda čím dál více posouvají dopředu, a proto se i výzkum spojený s magnetickou rezonancí a vývojem multimodálních kontrastních látek bude nadále zlepšovat a vyvíjet. Kontrastní látky jsou nedílnou součástí při zobrazování magnetickou rezonancí a fluorescenčního zobrazování, a proto i ty by se měly nadále vyvíjet. Další vývoj může spočívat například v chemickém navazování léčiv na kontrastní látky, které by mohly složit jako nosiče léků.

Seznam použité literatury

- [1] BENEŠ, J., D. JIRÁK a F. VÍTEK. *Základy lékařské fyziky*. 4.vyd. Praha: Karolinum, 2015. ISBN 978-80-246-2645-1.
- [2] MAŇASKOVÁ, Dana. *Magnetická rezonance - MRI - NMR* [online]. 2010 [cit. 2012-01-16]. Dostupné také z: http://medicinman.cz/?p=metody&p_sub=mr
- [3] SEDLÁŘ, M., E. STAFFA a V. MORNSTEIN. *Zobrazovací metody využívající neionizující záření*. Praha: Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7156-8. Dostupné také z: http://www.med.muni.cz/biofyz/zobrazovacimetody/files/zobrazovaci_metody.pdf
- [4] FERDA, Jiří et al. *Inovativní zobrazovací metody*. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-186-5.
- [5] ROSINA, Jozef. *Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-2474-237-3.
- [6] CONSTANTINIDES, Christakis. *Magnetic resonance imaging: the basics*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2014. ISBN 978-1-4822-1731-5.
- [7] MISPELTER, J., M. LUPU a A. BRIGUET. *NMR Probeheads for biophysical and biomedical experiments: theoretical & practical guidelines*. 2.vyd. London: Imperial College Press, 2015. ISBN 978-1-84816-662-2.
- [8] SEIDL, Zdeněk. *Radiologie pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-4108-6.
- [9] TENG, Quincy. *Structural biology: practical NMR applications*. 2nd ed. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4899-7382-5.
- [10] CLARIDGE, Timothy D. W. *High-resolution NMR techniques in organic chemistry*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-08-099986-9.
- [11] EATON, Gareth R. et al. *Quantitative EPR*. New York: Springer, 2010. ISBN 3211929479.

- [12] BUSHONG, Stewart C. a Geoffrey D. CLARKE. *Magnetic resonance imaging: physical and biological principles*. 4th ed. St. Louis: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-323-07354-7.
- [13] VASSILIOU, Vassilios et al. Magnetic resonance imaging: Physics basics for the cardiologist. *JRSM Cardiovascular Disease*. 2018, 7. DOI 10.1177/2048004018772237.
- [14] HAIDEKKER, Mark A. *Medical imaging technology*. New York: Springer, 2013. ISBN 978-1-4614-7072-4.
- [15] WESTBROOK, Catherine. *Handbook of MRI technique*. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1-118-66162-8.
- [16] CHAVHAN, Govind B. *MRI Made Easy (for beginners)*. 2nd ed. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2013. ISBN 978-9-3515-2047-4.
- [17] FERDA, Jiří et al. *Základy zobrazovacích metod*. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-164-3.
- [18] MAJUMDAR, A., R. K. WARD a K. INIEWSKY. *MRI: physics, image reconstruction and analysis*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group, 2016. ISBN 978-1-4822-9889-5.
- [19] BROWN, Keith C. *Essentials mathematics for NMR and MRI spectroscopists*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2017. ISBN 978-1-78262-797-5.
- [20] CALLAGHAN, Paul T. *Translational dynamics and magnetic resonance: principles of pulsed gradient spin echo NMR*. Oxford: Oxford University Press, 2014. ISBN 978-0-19-870082-1.
- [21] TÓTH, É. a A. E. MERBACH, eds. *The chemistry of contrast agents in medical magnetic resonance imaging*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2013. ISBN 978-1-119-99176-2.

Seznam obrázků

Obrázek 1: *Precese*

Obrázek 2: *Zeemanův jev, štěpení energetických hladin v závislosti na zvyšujícím se magnetickém poli*

Obrázek 3: *Sklopení vektoru magnetizace do kolmé roviny působením pole B_1 buzeného proudem vysílací cívky*

Obrázek 4: *Průběh T_1 relaxace*

Obrázek 5: *Průběh T_2 relaxace*

Obrázek 6: *Signál FID a jeho detekce*

Obrázek 7: *Pasážování buněk*

Obrázek 8: *HepG2 buňky*

Obrázek 9: *Nasazení buněk pro testování cytotoxicity*

Obrázek 10: *Nasazené HepG2 buňky*

Obrázek 11: *Mikrotitrační destička s buňkami a testovanou cytotoxickou látkou*

Obrázek 12: *Výměna média pro nárůst buněk*

Obrázek 13: *Buňky HepG2 bez cytotoxické látky*

Obrázek 14: *Buňky HepG2 s nejvyšší koncentrací cytotoxické látky*

Obrázek 15: *Buňky HepG2 s nejnižší koncentrací cytotoxické látky*

Obrázek 16: *Přidání MTT*

Obrázek 17: *Mikrotitrační destička před měřením na spektrofotometru*

Obrázek 18: *Peleta buněk HepG2*

Obrázek 19: *Umístění zkumavek do držáku*

Obrázek 20: *Boční pohled na držák se zkumavkami a zobrazení různě velkých pelet buněk ve zkumavkách*

Obrázek 21: *Objemová cívka*

Obrázek 22: *Výsledek měření z magnetické rezonance s rare faktorem 8*

Obrázek 23: *Výsledek měření z magnetické rezonance s rare faktorem 1*

Obrázek 24: *Výsledky fluorescenčního měření pro 1. myš*

Obrázek 25: *Výsledky fluorescenčního měření pro 2. myš*

Seznam tabulek

Tabulka 1: *Hodnoty naměřené při 495 nm s MTT 0,5 mg/ml a jejich zpracování*

Tabulka 2: *Hodnoty naměřené při 620 nm s MTT 0,5 mg/ml a jejich zpracování*

Tabulka 3: *Hodnoty naměřené při 495 nm s MTT 1 mg/ml a jejich zpracování*

Tabulka 4: *Hodnoty naměřené při 620 nm s MTT 1 mg/ml a jejich zpracování*

Seznam grafů

Graf 1: *Výsledky MTT Assay při 495 nm s MTT 0,5 mg/ ml*

Graf 2: *Výsledky MTT Assay při 620 nm s MTT 0,5 mg/ ml*

Graf 3: *Výsledky MTT Assay při 495 nm s MTT 1 mg/ ml*

Graf 4: *Výsledky MTT Assay při 620 nm s MTT 1mg/ ml*

Graf 5: *Výsledek měření na magnetické rezonanci s rare faktorem 8*

Graf 6: *Výsledek měření na magnetické rezonanci s rare faktorem 8 s intenzitou převedenou na SNR*

Graf 7: *Výsledek měření na magnetické rezonanci s rare faktorem 1*

Graf 8: *Výsledek měření na magnetické rezonanci s rare faktorem 1 s intenzitou převedenou na SNR*

Graf 9: *Výsledky fluorescenčního měření pro 1. myš*

Graf 10: *Výsledky fluorescenčního měření pro 2. myš*